



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Avaliação das propriedades antioxidantes e
toxicológicas de óleos essenciais e extratos
aquosos de algumas plantas aromáticas do
Alentejo (Portugal)**

Andreia Sofia dos Santos Piçarra

Orientadora: Prof^a. Doutora Maria do Rosário Martins

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2015



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Avaliação das propriedades antioxidantes e
toxicológicas de óleos essenciais e extratos
aquosos de algumas plantas aromáticas do
Alentejo (Portugal)**

Andreia Sofia dos Santos Piçarra

Orientadora: Prof^a. Doutora Maria do Rosário Martins

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2015

Agradecimentos

À Prof.^a Doutora Maria do Rosário Martins pela sua orientação, motivação, auxílio, amizade e paciência ao longo da realização deste trabalho.

À Mestre Sílvia Arantes pela sua amizade, carinho, companhia e por toda a ajuda disponibilizada ao longo de todo este trabalho, bem como conhecimentos transmitidos.

À Dra Fátima Candeias pelo apoio e ajuda prestada nos ensaios de manipulação animal.

À Anabela Cabeça, técnica do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia por toda a ajuda prestada ao longo deste trabalho, bem como a sua amizade, compreensão, paciência e motivação que demonstrou para comigo.

Às técnicas de laboratório D. Esperança Alves, D. Jesuína Mósca, D. Maria Helena Carvalho e D. Custódia Canivete pela sua disponibilidade e amizade.

Ao Departamento de Química da Universidade de Évora pela disponibilização dos reagentes e equipamentos necessários ao longo deste estudo.

Ao ICAAM- Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas pela disponibilização dos reagentes e equipamentos necessários ao longo deste estudo.

A todos os meus amigos e colegas que de algum modo estiveram presentes ao longo da realização deste trabalho, pela sua amizade, carinho e suporte nos momentos importantes. Quero agradecer em especial à Sandra Rodrigues por toda a sua ajuda no laboratório quando necessário, amizade, compreensão e carinho, à Vânia Dantas pela sua amizade, carinho e companhia no laboratório ao longo da realização deste trabalho. À Ana Costa pela sua amizade, compreensão e motivação. À Marta Mateus, pela sua amizade e ajuda ao longo da escrita do trabalho.

A toda a minha família, especialmente aos meus pais, por estarem ao meu lado em todos os momentos e pela sua amizade. Ao meu irmão pela sua compreensão, paciência e carinho comigo todos os dias, sejam eles bons ou maus.

Ao meu namorado, obrigada por toda a sua amizade e carinho, bem como compreensão, motivação e grande paciência ao longo da realização deste trabalho, por ter sido o meu braço direito, sempre presente em todos os momentos.

Por fim, quero dedicar este trabalho e agradecer aos meus avós Francisco e Rosário, por terem sido incansáveis ao longo de todo o meu percurso académico e de toda a minha vida, por terem lutado por mim e nunca me terem deixado desistir. Por todo o seu amor, carinho, compreensão, motivação, ajuda e educação, por me terem ajudado a tornar na pessoa que sou hoje.

A todos muito Obrigada

Abreviaturas

AST- aspartato aminotransferase, do inglês *aspartate aminotransferase*

ALT- alanina aminotransferase, do inglês *alanine aminotransferase*

ALP- fosfatase alcalina, do inglês *alkaline phosphatase*

ATP- trifosfato de adenosina, do inglês *adenosine triphosphate*

BHT- 2,6-di-*t*-tritol-4-metilfenol , do inglês *butylated hydroxytoluene*

CAT-catalase

CL₅₀- concentração letal para 50 % da população

DL₅₀- dose letal para 50 % da população

DMSO- dimetilsulfóxido, do inglês *dimethyl sulfoxide*

DNA- ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*

DPPH- radical-2,2-difenil-1-picril-hidrazil, do inglês *2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl*

EA- extrato aquoso, do inglês *aqueous extract*

FID- detetor de ionização de chama, do inglês *flame ionization detector*

GC- cromatografia gasosa, do inglês *gas chromatography*

HMG-CoA- Hidroxi-β-metil-glutaril, do inglês *hydroxy-β-methyl-glutaryl*

IC₅₀- concentração inibitória de 50 % de atividade, do inglês *inhibitory concentration*

IPP-pirofosfato de isopentilo, do inglês *isopentyl diphosphate*

LDH- lactato desidrogenase, do inglês *lactate dehydrogenase*

OCDE- Organização para a Cooperação e desenvolvimento Económico

OE- óleo essencial, do inglês *essential oil*

OMS- Organização mundial de saúde, do inglês *World health organization*

PLP- fosfato de piridoxal, do inglês *pyridoxal phosphate*

ROS- espécies reativas de oxigénio, do inglês *reactive oxygen species*

SOD-superóxido dismutase

UV-Vis- espectrometria de absorção molecular ultra violeta – visível, +do inglês *ultraviolet - visible molecular absorption spectrometry*

Resumo

«Avaliação das propriedades antioxidantes e toxicológicas de óleos essenciais e extratos aquosos de algumas plantas aromáticas do Alentejo (Portugal)»

Neste trabalho procedeu-se à caracterização química e avaliação das propriedades antioxidantes e toxicológicas de óleos essenciais (OEs) e extratos aquosos de duas plantas aromáticas do Alentejo: *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* (L.) Savi (erva-das-azeitonas, nêveda) e *Foeniculum vulgare* Miller (funcho, funcho-doce). Os OEs apresentaram elevada atividade antioxidante pelo método do β -caroteno/ácido linoleico ($160 < IC_{50} < 854 \mu\text{g/mL}$). Os extratos apresentaram elevada atividade antioxidante pelos diferentes métodos estudados.

Os OEs e extratos apresentaram baixa toxicidade em ratinhos Swiss ($DL_{50} \geq 2000 \text{ mg/kg}$). A quantificação das atividades enzimáticas ALT, AST, ALP no soro e dos biomarcadores ureia e creatinina no soro e na urina permitiram monitorizar as funções hepática e renal e despistar possíveis efeitos tóxicos.

O elevado potencial antioxidante e baixa toxicidade observada após administração oral dos OEs e extratos de *C. nepeta* e *F. vulgare* sugerem a sua potencial aplicação na industrial alimentar e/ou farmacêutica, no entanto, serão necessários estudos futuros para definir uma dose segura.

Palavras chave: *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* (L.) Savi, *Foeniculum vulgare* Miller, óleos essenciais, extratos aquosos, composição química, atividade antioxidante, toxicidade

Abstract

«Evaluation of antioxidant and toxicological properties of essential oils and aqueous extracts of some aromatic herbs from Alentejo (Portugal) »

In the present work, the chemical characterization and the evaluation of antioxidant and toxicological properties of essential oils (EOs) and aqueous extracts of two herbs from Alentejo: *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* (L.) Savi (herb-of-olives, catmint) and *Foeniculum vulgare* Miller (Fennel, Sweet fennel) were carried out. EOs showed high antioxidant activity by the β -carotene/linoleic acid method ($160 < IC_{50} < 854 \mu\text{g/mL}$) however the extracts showed high antioxidant activity either by the radical DPPH, β -carotene/linoleic acid and reducing power methods.

EOs and aqueous extracts administered *per os* showed low toxicity in Swiss mice ($LD_{50} \geq 2000 \text{ mg/kg}$). Quantification of ALT, AST, ALP in the serum and biomarkers urea and creatinine in the serum and urine allowed the screening of potential toxic effects and the monitoring of liver and kidney functions.

The high antioxidant potential and low toxicity of EOs and aqueous extracts of *C. nepeta* and *F. vulgare* suggested their potential application in food and/or pharmaceutical industry; however, further studies are required in order to define a safe dose.

Keywords: *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* (L.) Savi, *Foeniculum vulgare* Miller, essential oils, aqueous extracts, chemical composition, antioxidant activity, toxicity

Índice

1. Problemática	1
2. Objetivos	2
2.1 Objetivo geral	2
2.2 Objetivos específicos.....	2
3. Introdução	4
3.1 Plantas aromáticas e medicinais	4
3.1.1 Processos metabólicos nas plantas	4
3.1.2 Óleos essenciais	8
3.1.3 Atividades biológicas das plantas aromáticas e medicinais	9
3.2 Estudos de avaliação da toxicidade	12
3.2.1 Ensaaios de toxicidade aguda	12
3.2.1.1 Letalidade em <i>Artemia salina</i>	13
3.2.1.2 Avaliação in vivo da toxicidade aguda.....	13
3.2.1.2.1 Avaliação bioquímica da toxicidade hepática	13
3.2.1.2.2 Avaliação bioquímica da toxicidade renal.....	17
3.3 Plantas aromáticas em estudo	19
3.3.1 <i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>nepeta</i> (L.) Savi.....	19
3.3.2 <i>Foeniculum vulgare</i> Miller.....	20
4. Materiais e métodos	23
4.1 Seleção e preparação das plantas.....	23
4.2 Obtenção dos óleos essenciais e extratos aquosos.....	23
4.3 Análise da composição química dos óleos essenciais por cromatografia gasosa (GC)	23
4.4 Caracterização química dos extratos aquosos	24
4.4.1 Pesquisa fitoquímica	24
4.4.2 Quantificação dos fenóis totais	26
4.4.3 Quantificação dos flavonóides totais	27
4.5 Avaliação da atividade antioxidante.....	28
4.5.1 Método do radical DPPH [•]	28
4.5.2 Método do β -caroteno/ácido linoleico	29
4.5.3 Método do poder redutor	31

4.6	Avaliação da toxicidade em <i>Artemia salina</i>	32
4.7	Avaliação da toxicidade «in vivo»	33
4.7.1	Avaliação bioquímica da toxicidade hepática	33
4.7.1.1	Aspartato aminotransferase (AST) (EC 2.6.1.1)	34
4.7.1.2	Alanina aminotransferase (ALT) (EC 2.6.1.2)	34
4.7.1.3	Fosfatase alcalina (ALP) (EC 3.1.3.1)	35
4.7.2	Avaliação bioquímica da toxicidade renal	36
4.7.2.1	Análise sumária da urina ou Urina tipo II	36
4.7.2.2	Creatinina	37
4.7.2.3	Clearance da Creatinina	37
4.7.2.4	Ureia	38
5.	Resultados e discussão	39
5.1	Caraterização química dos óleos essenciais	39
5.2	Caraterização química dos extratos aquosos	43
5.3	Avaliação das propriedades antioxidantes	45
5.3.1	Método do radical livre DPPH [•]	45
5.3.2	Método do β -caroteno/ácido linoleico	47
5.3.3	Método do poder redutor	48
5.3.4	Avaliação da atividade antioxidante dos OEs e dos extratos aquosos pelos diferentes métodos	50
5.4	Avaliação das propriedades toxicológicas	53
5.4.1	Letalidade em <i>Artemia salina</i>	53
5.4.2	Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i>	55
6.	Conclusões e perspetivas futuras	63
7.	Referências bibliográficas	66
8.	Anexos	76

Índice de figuras

Figura 1 - Metabolitos secundários- principais precursores (Adaptado de Ghasemzadeh & Jaafar,2011).....	4
Figura 2 -Via metabólica do ácido chiquímico (Adaptado de Iriti &Faoro,2009).....	5
Figura 3 -Via metabólica do ácido mevalónico, com formação de compostos terpénicos (Adaptado de Iriti & Faoro,2009)	7
Figura 4-Alguns exemplos de compostos presentes nos óleos essenciais.....	8
Figura 5- Principais atividades biológicas das plantas aromáticas e o seu uso nas diferentes indústrias (Adaptado de Christaki <i>et al.</i> ,2012)	9
Figura 6- Classificação dos antioxidantes (Adaptado de Carochio & Ferreira, 2013).	11
Figura 7- Sistemas enzimáticos antioxidantes (Adaptado de Morón & Castilla-Cortázar, 2012)	12
Figura 8- Estrutura do hepatócito (Adaptado de Townsend <i>et al.</i> ,2012).....	14
Figura 9- Unidade funcional do rim, nefrónio e o transporte de substâncias neste (Adaptado de Patton & Thibodeau,2012)	17
Figura 10- <i>Calamintha nepeta</i> (L.) Savi subsp <i>nepeta</i> , Herdade da Mitra, Évora	20
Figura 11- <i>Foeniculum vulgare</i> Miller	21
Figura 12- Componentes maioritários do óleo essencial de funcho (Adaptado de Rather <i>et al.</i> ,2012).....	21
Figura 13 - Reação do ácido pirogálico com o molibdénio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu (Adaptado de Oliveira <i>et al.</i> ,2009).	26
Figura 14 - Formação do complexo alumínio-flavonóide (quercetina) (Adaptado de Frederice <i>et al.</i> ,2010).....	27
Figura 15- Reação de redução do radical DPPH na presença de espécies antioxidantes (Adaptado de Amorati <i>et al.</i> ,2013).	28
Figura 16 - Oxidação do ácido linoleico (Adaptado de Jayasena <i>et al.</i> ,2013).....	29
Figura 17- Reação de redução do Fe (III) a Fe (II) na presença de substâncias antioxidantes (Adaptado de Jayanthi & Lalitha, 2011).....	31
Figura 18- Reação de transaminação catalisada pela Aspartato aminotransferase (Adaptado de McPherson & Pincus,2011)	34
Figura 19 - Reação de transaminação catalisada pela alanina aminotransferase (Adaptado de McPherson & Pincus,2011).....	35
Figura 20- Reação catalisada pela fosfatase alcalina (Adaptado de McPherson & Pincus,2011).....	35
Figura 21- Quantificação de creatinina (Adaptado de McPherson & Pincus,2011).....	37
Figura 22- Hidrólise da ureia (Adaptado de Almeida <i>et al.</i> ,2008).	38
Figura 23 -Quantificação de fenóis totais (A) e flavonóides totais (B).....	44
Figura 24- Atividade antioxidante dos óleos essenciais (A), extratos (B) e padrões (C) pelo método do radical DPPH'	45
Figura 25- Atividade antioxidante obtida pelo método β -caroteno/ácido linoleico.....	47
Figura 26- Resultados de atividade antioxidante dos óleos essenciais (A), extratos aquosos (B) e dos padrões (C) pelo método do poder redutor.	49
Figura 27- Curvas dose-resposta obtidas nos ensaios de letalidade em <i>Artemia salina</i>	54
Figura 28- Valores de atividade enzimática biomarcadores de função hepática para nos soros dos animais administrados via oral com óleos essenciais de <i>C.nepeta</i> e <i>F.vulgare</i> . 56	

Figura 29 - Quantificação da creatinina (A) e ureia (B) nos soros dos animais após administração oral com os óleos essenciais de <i>C.nepeta</i> e <i>F.vulgare</i> . Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas para cada uma das concentrações apresentaram diferenças significativas (Anexo VII, Quadros 29 e 30).	58
Figura 30- [Creatinina] e [ureia] mg/mL na urina dos animais administrados com óleo essencial de <i>C.nepeta</i> . A – Creatinina B- Ureia. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas para cada dia de ensaio apresentaram diferenças significativas (Anexo VII, Quadros 34-39 e Quadros 46-51).	60
Figura 31- [Creatinina] e [ureia] mg/mL na urina dos animais administrados com óleo essencial de <i>F.vulgare</i> . A- Creatinina B- Ureia. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas para cada uma das concentrações apresentaram diferenças significativas (Anexo VII, Quadros 40-45 e Quadros 52-57).....	61
Figura 32- Clearance da creatinina (mL/min) para os animais administrados com óleo essencial de funcho e calaminta. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão.	62
Figura 33- Cromatograma do óleo essencial de <i>Foeniculum vulgare</i> por análise GC-FID..	76
Figura 34- Cromatograma do óleo essencial de <i>Calamintha nepeta</i> por análise GC-FID...	76
Figura 35- Curvas de calibração obtidas na quantificação de fenóis e flavonóides totais...	77
Figura 36- Atividade antioxidante pelo método do radical DPPH.	77
Figura 37- Atividade antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoleico.	78
Figura 38- Atividade antioxidante pelo método do poder redutor.	79
Figura 39- Curvas de calibração do controlo (CAL) obtidas para as aminotransferases	81
Figura 40- Curva de calibração do controlo (CAL).	81

Índice de Quadros

Quadro 1- Taxonomia das plantas em estudo : <i>C.nepeta</i> subsp <i>nepeta</i> e <i>F.vulgare</i>	19
Quadro 2 – Valores do rendimento de extração, massa volúmica e índices de refração dos óleos essenciais de <i>C.nepeta</i> e de <i>F.vulgare</i>	39
Quadro 3 – Caracterização química dos óleos essenciais de <i>C.nepeta</i> e <i>F.vulgare</i> por GC-FID (coluna Supelcovax TM 10).....	40
Quadro 4- Resultados da pesquisa fitoquímica dos extratos aquosos de <i>C.nepeta</i> e de <i>F.vulgare</i>	43
Quadro 5- Valores de IC ₅₀ obtidos pelo método do radical livre DPPH para os extratos aquosos e padrões.	46
Quadro 6- Valores de IC ₅₀ obtidos para os óleos essenciais e extratos aquosos pelo método do β -caroteno/ácido linoleico.	48
Quadro 7- Valores de IC ₅₀ obtidos para os extratos aquosos e padrões pelo método do poder redutor.	50
Quadro 8- Atividade antioxidante dos óleos essenciais e extratos aquosos expressa em equivalentes de quercetina ($\mu\text{g}/\text{mg}$).	51
Quadro 9- Atividade antioxidante dos óleos essenciais e extratos pelos métodos do radical DPPH, β -caroteno/ácido linoleico e poder redutor expressa em equivalentes de ácido ascórbico ($\mu\text{g}/\text{mg}$).	51
Quadro 10- Atividade antioxidante dos óleos essenciais e extratos pelos métodos do poder redutor expressa em equivalentes de BHT ($\mu\text{g}/\text{mg}$).	51
Quadro 11- Valores de DL ₅₀ obtidos para os óleos essenciais e extratos aquosos	80
Quadro 12- Valores médios peso animal (g) ao longo dos diversos dias, nos animais administrados com óleo essencial de <i>C.nepeta</i>	80
Quadro 13- Valores médios peso animal (g) ao longo dos diversos dias, nos animais administrados com óleo essencial de <i>F.vulgare</i>	80
Quadro 14- Análise sumária da urina nas urinas dos animais administrados via oral com óleo essencial de <i>F.vulgare</i> nas diferentes doses e dias.....	82
Quadro 15- Análise sumária da urina nas urinas dos animais administrados via oral com óleo essencial de <i>C.nepeta</i> nas diferentes doses e dias.	83
Quadro 16- Análise de variância ANOVA para avaliação da atividade antioxidante dos OEs pelo método DPPH	84
Quadro 17- Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH para os OEs.....	84
Quadro 18- Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH para os extratos aquosos.	85
Quadro 19-Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH dos extratos aquosos.....	85
Quadro 20- Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antioxidante dos OEs pelo método β -caroteno/ácido linoleico.....	86
Quadro 21- Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoleico para os OEs.....	86
Quadro 22- Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos aquosos pelo método β -caroteno/ácido linoleico.....	87
Quadro 23- Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoleico para os extratos aquosos.....	87

Quadro 24- Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antioxidante dos OEs aquosos pelo método do poder redutor.....	88
Quadro 25- Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante pelo método do poder redutor para os OEs.....	88
Quadro 26- Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos aquosos pelo método do poder redutor.	89
Quadro 27- Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante pelo método do poder redutor para os extratos aquosos.....	89
Quadro 28- Análise de variância ANOVA para os biomarcadores séricos.	90
Quadro 29- Teste de Duncan para avaliação da enzimática da ALT para os OEs.	90
Quadro 30- Teste de Duncan para avaliação da enzimática da AST para os OEs.....	91
Quadro 31- Teste de Duncan para avaliação da enzimática da ALP para os OEs.	91
Quadro 32- Teste de Duncan para quantificação de creatinina no soro dos animais administrados com o OE de <i>F.vulgare</i> e <i>C.nepeta</i>	92
Quadro 33- Teste de Duncan para quantificação de ureia no soro dos animais administrados com o OE de <i>F.vulgare</i> e <i>C.nepeta</i>	92
Quadro 34-Análise de variância ANOVA para a quantificação de creatinina nas urinas dos animais administrados com OE de <i>C.nepeta</i>	93
Quadro 35- Teste de Duncan para quantificação de creatinina na urina dos animais administrados com o OE de <i>C.nepeta</i> no dia 0.	93
Quadro 36 -Teste de Duncan para quantificação de creatinina na urina dos animais administrados com o OE de <i>C.nepeta</i> no dia 1.....	94
Quadro 37 -Teste de Duncan para quantificação de creatinina na urina dos animais administrados com o OE de <i>C.nepeta</i> no dia 2.	94
Quadro 38 -Teste de Duncan para quantificação de creatinina na urina dos animais administrados com o OE de <i>C.nepeta</i> no dia 7.	95
Quadro 39- Teste de Duncan para quantificação de creatinina na urina dos animais administrados com o OE de <i>C.nepeta</i> no dia 14.	95
Quadro 40- Análise de variância ANOVA para a quantificação de creatinina nas urinas dos animais administrados com OE de <i>F.vulgare</i>	96
Quadro 41-Teste de Duncan para quantificação de creatinina na urina dos animais administrados com o OE de <i>F.vulgare</i> no dia 0.....	96
Quadro 42- Teste de Duncan para quantificação de creatinina na urina dos animais administrados com o OE de <i>F.vulgare</i> no dia 1.....	97
Quadro 43- Teste de Duncan para quantificação de creatinina na urina dos animais administrados com o OE de <i>F.vulgare</i> no dia 2.....	97
Quadro 44-Teste de Duncan para quantificação de creatinina na urina dos animais administrados com o OE de <i>F.vulgare</i> no dia 7.....	98
Quadro 45-Teste de Duncan para quantificação de creatinina na urina dos animais administrados com o OE de <i>F.vulgare</i> no dia 14.....	98
Quadro 46- Análise de variância ANOVA para a quantificação de ureia nas urinas dos animais administrados com OE de <i>C.nepeta</i>	99
Quadro 47- Teste de Duncan para quantificação de ureia na urina dos animais administrados com o OE de <i>C.nepeta</i> no dia 0.	99
Quadro 48- Teste de Duncan para quantificação de ureia na urina dos animais administrados com o OE de <i>C.nepeta</i> no dia 1.....	100
Quadro 49- Teste de Duncan para quantificação de ureia na urina dos animais administrados com o OE de <i>C.nepeta</i> no dia 2.	100

Quadro 50- Teste de Duncan para quantificação de ureia na urina dos animais administrados com o OE de <i>C.nepeta</i> no dia 7.....	101
Quadro 51 -Teste de Duncan para quantificação de ureia na urina dos animais administrados com o OE de <i>C.nepeta</i> no dia 14.	101
Quadro 52- Análise de variância ANOVA para a quantificação de ureia nas urinas dos animais administrados com OE de <i>F.vulgare</i>	102
Quadro 53- Teste de Duncan para quantificação de ureia na urina dos animais administrados com o OE de <i>F.vulgare</i> no dia 0.....	102
Quadro 54- Teste de Duncan para quantificação de ureia na urina dos animais administrados com o OE de <i>F.vulgare</i> no dia 1.....	103
Quadro 55- Teste de Duncan para quantificação de ureia na urina dos animais administrados com o OE de <i>F.vulgare</i> no dia 2.....	103
Quadro 56- Teste de Duncan para quantificação de ureia na urina dos animais administrados com o OE de <i>F.vulgare</i> no dia 7.....	104
Quadro 57- Teste de Duncan para quantificação de ureia na urina dos animais administrados com o OE de <i>F.vulgare</i> no dia 14.....	104
Quadro 58 - Análise de variância ANOVA para a clearance da creatinina nos animais administrados com OE de <i>C.nepeta</i> e <i>F.vulgare</i>	105
Quadro 59- Teste de Duncan para avaliação da clearance da creatinina nos animais administrados com OE de <i>C.nepeta</i> e <i>F.vulgare</i>	105

1. Problemática

As plantas aromáticas são uma fonte de produtos naturais com propriedades biológicas, resultantes do seu metabolismo secundário, os quais são cada vez mais usados a par dos medicamentos convencionais ou, até mesmo, como seus substitutos, devidos às suas propriedades biológicas, designadamente, antioxidantes, antibacterianas e anti-tumorais (Sarikurkcu *et al*,2010). O potencial antioxidante de OEs e extratos de plantas são importantes na prevenção de patologias frequentemente associadas ao *stress* oxidativo, como as doenças neurodegenerativas e cancerígenas e também na prevenção de doenças cardiovasculares. Além disso, os OEs devido às suas propriedades antimicrobianas poderão ser muito úteis no combate de patogénicos multirresistentes. No entanto, apesar das múltiplas propriedades benéficas, em doses elevadas, devido à presença de múltiplas moléculas bioativas que podem induzir ou não efeitos nefastos para o organismo, torna-se crucial efetuar estudos de toxicidade, com vista a despistar possíveis efeitos tóxicos e estabelecer um intervalo de referência em que estes possam ser utilizados em doses consideradas seguras.

Os óleos essenciais e extratos de várias plantas aromáticas e medicinais (PAM) têm despertado o interesse em diversas indústrias, nomeadamente na indústria alimentar onde são utilizados como suplementos alimentares e na farmacêutica sendo uma fonte de fármacos naturais, justificando assim o aprofundamento do conhecimento científico nesta área, correlacionando-o com o saber e a prática tradicionais, de modo a permitir uma utilização adequada e segura em fitoterapia.

A região Alentejo é rica em plantas aromáticas, sendo estas muito utilizadas pela população não só como condimentos e na preservação dos alimentos, mas também na prática tradicional para a prevenção e tratamento de algumas patologias. Neste trabalho, selecionaram-se as plantas condimentares *Foeniculum vulgare* Miller e *Calamintha nepeta subsp. nepeta* (L.) Savi, as quais têm sido utilizados na medicina tradicional no tratamento/prevenção de perturbações do sistema digestivo. Neste estudo pretende-se avaliar as propriedades antioxidantes e toxicológicas dos seus óleos essenciais e extratos liofilizados (águas de decocção) de modo a valorizar o potencial de aplicação destes produtos e a avaliar a sua utilização segura.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo principal caraterizar química e biologicamente os OEs e extratos aquosos (águas de decocção) de duas espécies aromáticas do Alentejo *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* (erva-das-azeitonas, calaminta ou nêveda) e *Foeniculum vulgare* (funcho ou funcho doce), utilizadas como conservantes de alimentos e/ou como condimentos alimentares.

Assim, pretendeu-se caraterizar quimicamente os óleos essenciais e extratos aquosos das plantas em estudo, para poder correlacionar as propriedades observadas com os seus constituintes. Pretendeu-se avaliar as suas propriedades antioxidantes por diferentes métodos e determinar os valores de IC_{50} , com vista a inferir sobre os principais mecanismos de ação. Além disso, pretendeu-se também avaliar a toxicidade dos óleos e extratos, em ensaios de letalidade para *Artemia salina*, com a determinação dos valores de CL_{50} , bem como a toxicidade *in vivo* após administração oral dos óleos essenciais em ratinhos Swiss com a determinação dos valores da DL_{50} e em ratos Wistar para quantificação das atividades dos enzimas séricos ALT, AST e ALP e dos biomarcadores creatinina e ureia no soro e na urina para monitorização das funções hepáticas e renal e despiste de possíveis efeitos tóxicos nas doses administradas.

2.2 Objetivos específicos

Foram objetivos específicos do presente trabalho:

- Proceder à extração dos óleos essenciais das plantas seleccionadas por hidrodestilação, utilizando um aparelho tipo *Clevenger* e obter os extratos aquosos a partir das águas de decocção, com posterior liofilização;
- Determinar o rendimento de extração dos óleos essenciais e o rendimento de produção dos extratos aquosos;
- Caraterizar fisicamente os óleos essenciais com determinação do índice de refração e da densidade;

- Caracterizar quimicamente os óleos essenciais de *C.nepeta* e *F.vulgare* por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID);
- Caracterizar quimicamente os extratos aquosos liofilizados, por pesquisa fitoquímica e quantificação do conteúdo em fenóis totais e em flavonóides totais;
- Avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais e extratos aquosos pelos métodos do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazil), β -caroteno/ácido linoleico e quantificação do poder redutor, com vista a inferir sobre os diferentes mecanismos de ação antioxidante dos mesmos;
- Avaliar a letalidade dos óleos essenciais e extratos aquosos em *Artémia salina* com determinação do valor de CL₅₀;
- Determinar a atividade dos enzimas séricos AST, ALT e ALP no soro para monitorização da função hepática após ensaio de toxicidade aguda em ratos *Wistar*, com administração oral de OEs;
- Quantificar os biomarcadores creatinina e ureia no soro e na urina, determinar os valores de clearance da creatinina e interpretar os dados da análise sumária da urina (Urina tipo II), para monitorização da função renal;
- Interpretar os ensaios de monitorização hepática e renal com os resultados de estudos de toxicidade aguda em ratos *Wistar*, com determinação do valor de DL₅₀ em ratinhos *Swiss* após administração oral de óleos essenciais e extratos aquosos das plantas em estudo;
- Relacionar a elevada atividade antioxidante com a toxicidade.

3. Introdução

3.1 Plantas aromáticas e medicinais

As plantas aromáticas são ricas em compostos bioativos, provenientes do seu metabolismo secundário. Estes têm sido utilizadas na medicina tradicional, na prevenção e tratamento de patologias e também pelas suas propriedades nutracêuticas, como alimentos funcionais.

3.1.1 Processos metabólicos nas plantas

Os compostos bioativos provenientes do metabolismo secundário das plantas aromáticas são caracterizados pela sua estrutura molecular complexa e são compostos de baixo peso molecular. Estes, desempenham funções importantes, como por exemplo defesa de pragas, polinização e reprodução, desempenhando também um papel importante na adaptação das mesmas a determinadas condições ambientais, existindo diversos fatores que condicionam a presença e quantidade destes, nomeadamente a época de colheita, a estação do ano, o ciclo dia/noite, a luminosidade e a disponibilidade de nutrientes (García & Carril, 2009).

Os metabolitos secundários nas plantas aromáticas são assim constituídos por 3 principais classes, nomeadamente os compostos terpénicos, os fenóis e os alcalóides (Figura 1) (Ghasemzadeh & Jaafar, 2011).

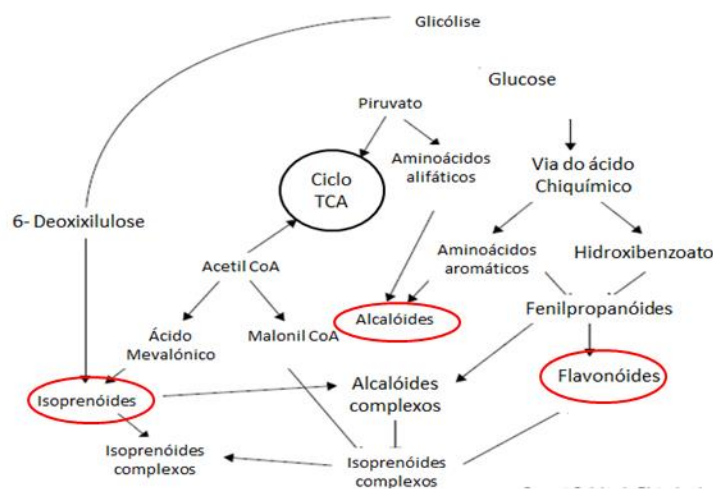


Figura 1 - Metabolitos secundários- principais percursos (Adaptado de Ghasemzadeh & Jaafar, 2011).

Estes compostos bioativos são provenientes de duas vias metabólicas principais, a via metabólica do ácido chiquímico e a via metabólica do ácido mevalónico. A via metabólica do ácido chiquímico (Figura 2), precursor dos fenóis, flavonóides e alcalóides, em que o ácido chiquímico é proveniente do metabolismo da via metabólica da glicólise e da via das pentoses fosfato, no qual, a eritrose 4- fosfato em conjunto com o fosfoenolpiruvato é convertida em ácido chiquímico, onde a partir do qual são sintetizados aminoácidos aromáticos que são importantes precursores da formação de metabolitos secundários nas plantas (Iriti & Faoro,2009).

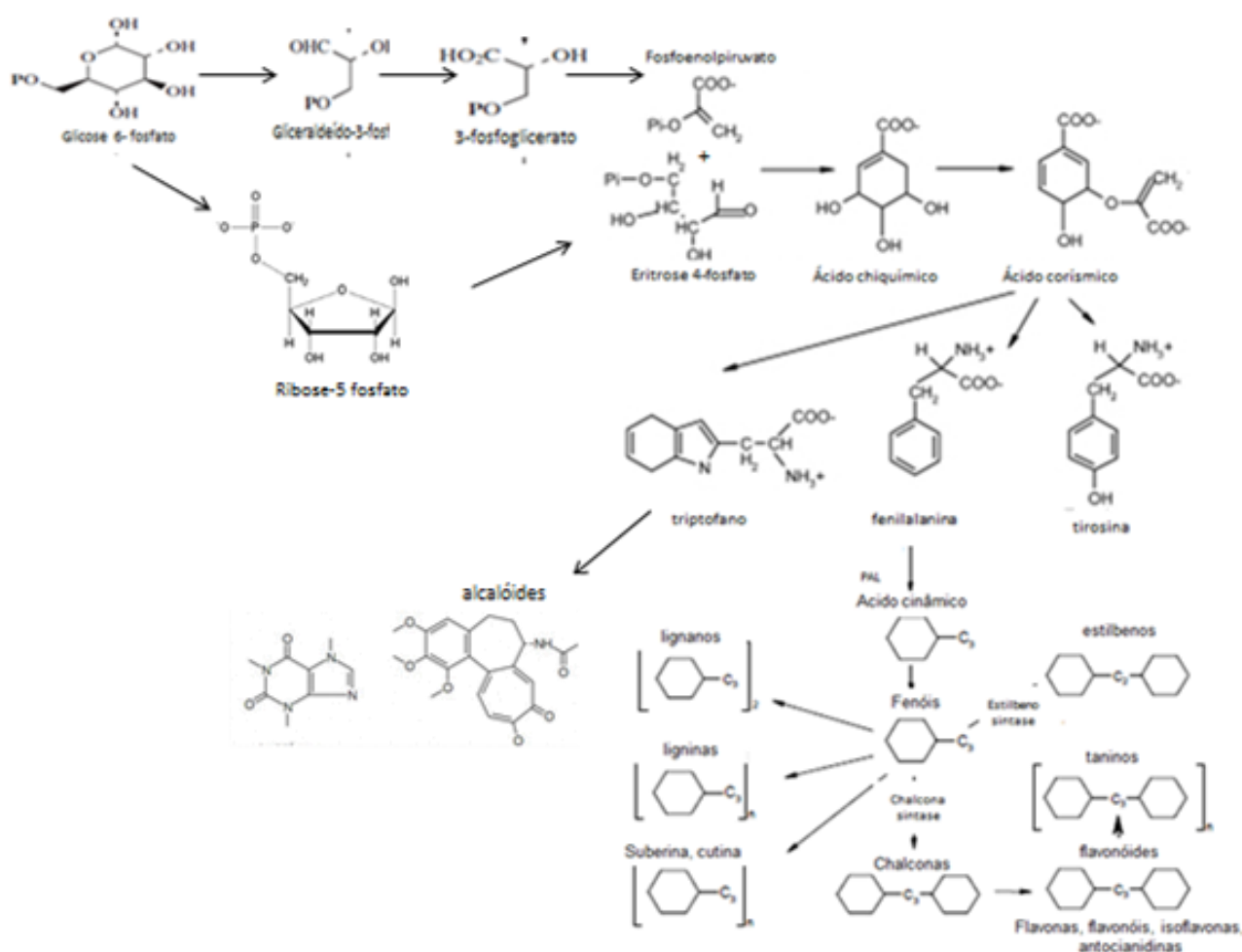


Figura 2 -Via metabólica do ácido chiquímico (Adaptado de Iriti & Faoro,2009)

Os compostos fenólicos provenientes desta via metabólica, são derivados do aminoácido fenilalanina, no qual este sofre perda dos seus grupos amina por ação do enzima fenilalanina-amónias-liase com a formação de ácido cinâmico, a partir do qual são, posteriormente sintetizados estes compostos (Figura 2). Estes, são importantes nas plantas aromáticas, pois desempenham funções de defesa e são potentes antioxidantes. Os fenóis possuem propriedades biológicas, como por exemplo antioxidantes, anti-

inflamatórias, anticancerígenas, sendo também importantes na proteção contra a aterosclerose e o envelhecimento precoce. Estas propriedades, parecem estar relacionadas com a sua capacidade redutora (Hodzic *et al.*,2009). As coumarinas por exemplo, são importantes na proteção das plantas contra microrganismos, insetos e herbívoros.

Os flavonóides pertencem à classe dos polifenóis, importantes, devido à sua potencialidade como antioxidantes. Esta capacidade parece estar relacionada com a sua estrutura molecular, a posição dos grupos hidroxilo, bem como outras características que lhes permitem atuarem como sequestradores de radicais livres (Pallab *et al.*,2013). A quercetina é um dos flavonóides mais abundantes na dieta alimentar, sendo um potente antioxidante, devido à sua capacidade de atuar como um potente sequestrador de radicais livres (Pallab *et al.*,2013). Estes, para além da sua importância na proteção das plantas, são também responsáveis pela formação de pigmentos. Dentro dos flavonóides existem outros dois grandes grupos, as flavonas e os flavanonóis que são responsáveis por proteger as células contra a radiação UV. Além disso este grupo de compostos também se mostrou eficaz contra radicais livres eliminando estes. A quercetina é um exemplo de um flavonóide importante que atua na defesa das plantas contra a luz UV (Mazid & Mohammad,2011; Giada,2013).

Os alcalóides também provenientes da via metabólica do ácido chiquímico, formados a partir do triptofano, são caracterizados por apresentarem baixo peso molecular e azoto na sua constituição (Yazaki, 2006; Mohammad,2011).

Por outro lado, os compostos terpénicos são metabolitos secundários provenientes da via metabólica do ácido mevalónico (Figura 3). Nesta via metabólica o precursor inicial é o acetil-CoA, no qual duas moléculas deste reajam de forma a formar o acetoacetil coA, o qual irá posteriormente formar β -hidroxi- β -metilglutaril (HMG-CoA). O HMG-CoA é posteriormente convertido em ácido mevalónico através da HMG-CoA redutase. A descarboxilação do ácido mevalónico, leva à formação de pirofosfato de isopentenilo (IPP), composto base da biossíntese dos isoprenóides (Dewick,2002; Iriti & Faoro,2009).

Os terpenos (Figura 3) são uma das principais classes de metabolitos secundários presentes nas plantas aromáticas, designadamente nos seus óleos essenciais. Os terpenos são compostos por várias unidades isopreno (C_5), formados por incorporação de unidades IPP, dando origem a várias classes, como os monoterpenos (C_{10}), compostos predominantes nos óleos essenciais, compostos com atividade inseticida (Iriti & Faoro,2009;Kumar *et al.*,2014; Peixoto *et al.*,2015).

Os sesquiterpenos (C_{15}), formados a partir do farnesil pirofosfato, também presentes nalguns óleos essenciais, são compostos que desempenham funções de defesa nas plantas, como anti-herbívoros e como reguladores da membrana na resposta ao *stress*

hídrico (Iriti & Faoro,2009). Os diterpenos (C_{20}), são importantes como repelentes para os insetos (Iriti & Faoro,2009).

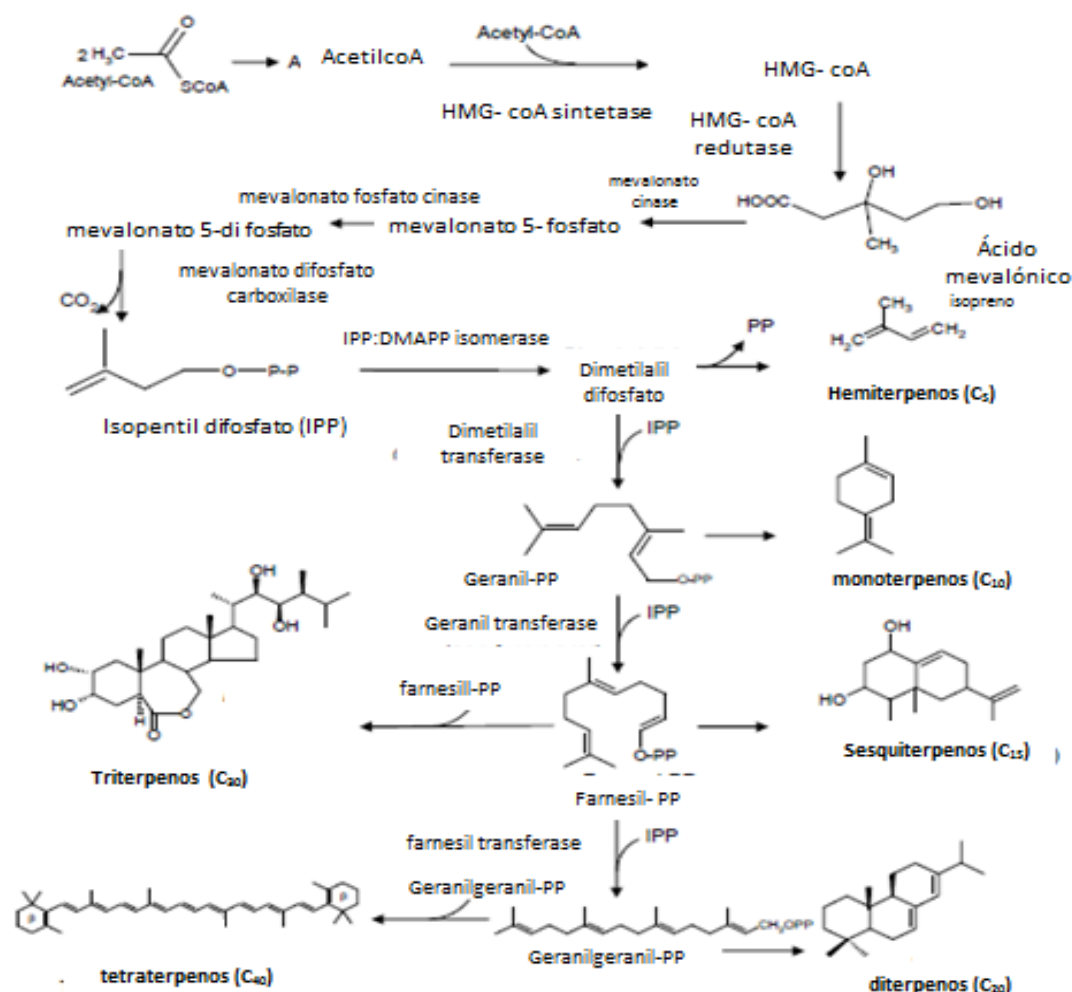


Figura 3 -Via metabólica do ácido mevalônico, com formação de compostos terpénicos (Adaptado de Iriti & Faoro,2009)

Os triterpenos (C_{30}), como o esqualeno vão dar origem aos compostos esteróis que são componentes importantes das membranas, nomeadamente membrana plasmática, onde atuam como reguladores dos canais e permitem a permeabilidade a moléculas pequenas atuando ao nível das cadeias de ácidos gordos (Dewick,2002; García & Carril,2009).

3.1.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais, são produtos do metabolismo secundário nas plantas e são caracterizados por serem substâncias voláteis com um forte odor que podem ser obtidas por diversos processos de hidrodestilação e de várias partes da planta, nomeadamente raízes, caules e folhas (Burt,2004; Bakkali *et al.*,2004; Miguel,2010; Amorati *et al.*,2013). A maioria dos óleos essenciais apresenta menor densidade que a água e são constituídos essencialmente por compostos terpénicos, os quais poderão representar cerca de 90% dos seus componentes, designadamente monoterpenos hidrocarbonados e oxigenados (Figura 4 A) e sesquiterpenos hidrocarbonados e oxigenados (Figura 4 B) (Bakkali *et al.*,2004; Miguel, 2010).

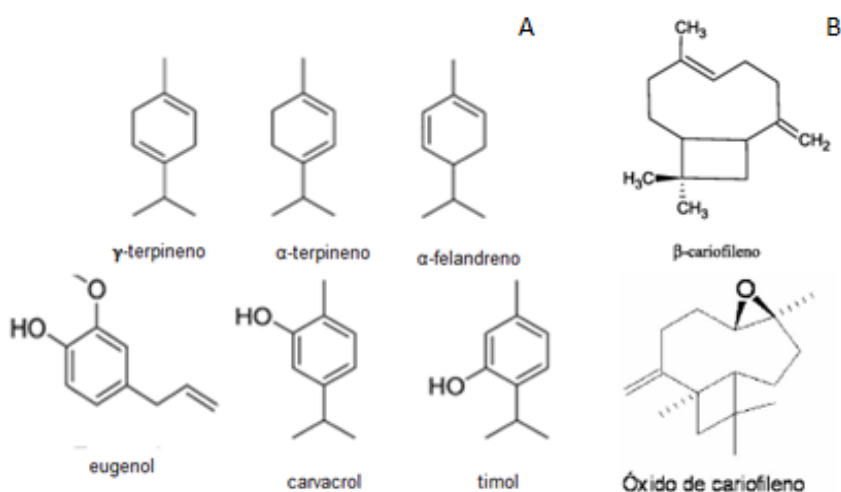


Figura 4-Alguns exemplos de compostos presentes nos óleos essenciais.

A-Monoterpenos oxigenados e hidrogenados B- Sesquiterpenos hidrocarbonados e oxigenados (Adaptado de Amorati *et al.*,2013).

Os óleos essenciais estão geralmente envolvidos nos processos de proteção das plantas aromáticas, podendo atuar na natureza como inseticidas, antibacterianos e até mesmo como agentes atrativos para os insetos de modo a promover a dispersão de pólen e agentes repelentes. Além da sua ação antimicrobiana, os óleos essenciais também têm sido descritos como detentores de propriedades antioxidantes com importância na preservação e capacidade de atuar na eliminação de radicais livres a nível biológico podendo ter um papel importante na prevenção de doenças causadas pela presença de radicais livres e *stress* oxidativo, como as doenças neurodegenerativas e oncológicas (Edris,2007).

3.1.3 Atividades biológicas das plantas aromáticas e medicinais

As plantas aromáticas são desde a antiguidade utilizadas na medicina tradicional com diversos fins, devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antiespasmódicas, diuréticas entre outras, apesar de muitas vezes estas propriedades não estarem validadas cientificamente (Pereira & Cardoso, 2012). Além disto, algumas plantas aromáticas são muito utilizadas como condimentos alimentares pelas populações locais, o que tem despertado o interesse de diversas indústrias, como a indústria alimentar e farmacêutica devido às propriedades biológicas que estes podem apresentar. Na Figura 5, encontra-se um esquema com algumas das propriedades biológicas que podem estar presentes nas plantas aromáticas e indicação das diversas indústrias em que têm sido utilizadas (Christaki *et al.*, 2012).

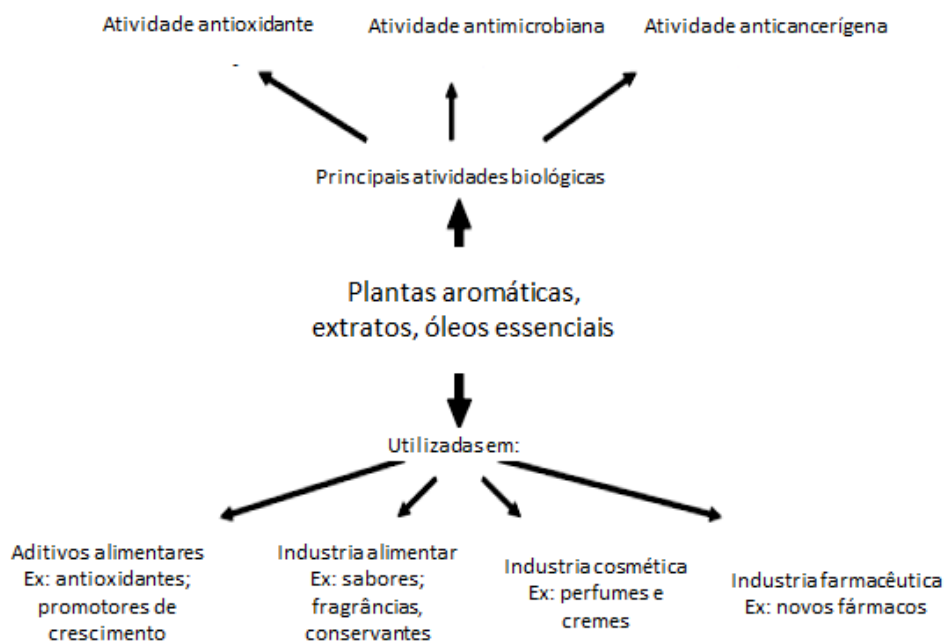


Figura 5- Principais atividades biológicas das plantas aromáticas e o seu uso nas diferentes indústrias (Adaptado de Christaki *et al.*, 2012)

As plantas aromáticas devido às propriedades biológicas (Figura 5) dos seus metabolitos secundários poderão apresentar propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, anticancerígenas, entre outras (Christaki *et al.*, 2012).

A atividade antioxidante presente nos compostos bioativos de plantas aromáticas têm demonstrado potencial para combater o *stress* oxidativo e prevenção de patologias associadas, como doenças neurodegenerativas, cardíacas e outras (Anaysor *et al.*, 2010). O *stress* oxidativo, ocorre quando num organismo existe excesso da produção de espécies

reativas de oxigénio (ROS) e as defesas antioxidantes são menores, não ocorrendo assim em equilíbrio entre a produção e eliminação destes (Carocho & Ferreira, 2013). Este, está relacionado com vários fatores endógenos e exógenos, nomeadamente fatores exógenos como a alimentação e o tipo de dieta, a presença de determinadas toxinas ambientais e até mesmo a poluição e o tabagismo podem influenciar o aumento deste, levando ao envelhecimento precoce e determinadas patologias associadas (Atukeren & Yigitoglu, 2013; Rahal *et al.*, 2014).

As defesas antioxidantes endógenas em condições de *stress* oxidativo não atuam em condições e ocorre a formação de várias espécies reativas de oxigénio, como o radical superóxido (O_2^-), hidróxido (OH^\cdot) e peróxido de hidrogénio que são responsáveis por danificar a nível celular, quer ao nível das membranas lipídicas induzindo a peroxidação lipídica, quer a nível proteico induzindo a oxidação ou fragmentação destas ou até mesmo a nível do DNA podendo ser reversíveis ou não, levando consequentemente à apoptose (Smith *et al.*, 2005).

Os antioxidantes podem exercer a sua ação através da sua capacidade para atuarem como sequestradores dos radicais livres removendo assim as espécies responsáveis por danos oxidativos, atuando com protetores das membranas lipídicas, inibindo o processo de peroxidação lipídica, bem como redutores do Fe^{3+} a Fe^{2+} , permitindo que não ocorra oxidação (Brewer, 2011).

São diversos os métodos que permitem determinar ou quantificar a atividade antioxidante destes compostos bioativos, permitindo inferir sobre os mecanismos de ação preferencial por estes, nomeadamente o método da redução do radical DPPH que permite avaliar a capacidade de substâncias antioxidantes transferirem um eletrão da amostra em estudo para o radical DPPH, promovendo a sua redução. Este método é simples e eficaz, pelo que é bastante utilizado nesta área (Miguel, 2010). O método do β -caroteno/ácido linoleico, permite estudar outro mecanismo de ação antioxidante, nomeadamente a oxidação do β -caroteno devido à formação do radical do ácido linoleico que vai atacar as duplas ligações do β -caroteno e promover a oxidação deste. Na presença de substâncias antioxidantes, a oxidação deste é retardada (Miguel, 2010). Existem também outros métodos de avaliar a atividade antioxidante cujo mecanismo está relacionado com a redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} na presença de espécies redutoras, ou seja com atividade antioxidante. Um desses métodos, é o método do poder redutor, no qual na presença de substâncias antioxidantes, observa-se a mudança da coloração de amarelo para verde/azul, consoante o poder redutor das amostras em estudo, devido a formação de um complexo (Miguel, 2010). Além dos métodos descritos acima, existem outros dentro dos mesmos mecanismos de ação descritos acima, tais como os métodos do ácido tiobarbitúrico (TBARS), poder redutor antioxidante do ferro (FRAP), entre outros.

Os antioxidantes podem ser obtidos de forma exógena, através dos alimentos, como por exemplo as vitaminas A, B, C, E, os carotenóides, os fenóis, flavonóides e os alcalóides (Figura 6) (Carocho & Ferreira, 2013).

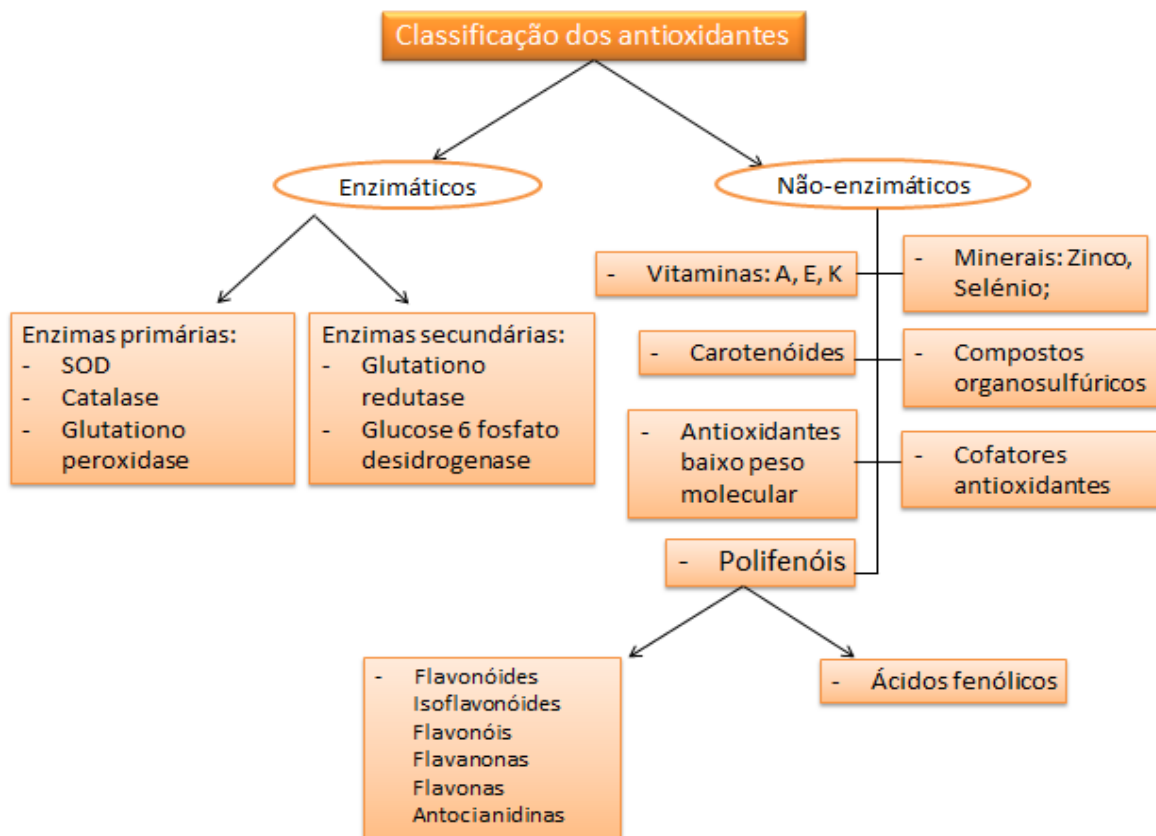


Figura 6- Classificação dos antioxidantes (Adaptado de Carocho & Ferreira, 2013).

Por outro lado, os organismos vivos possuem vários sistemas antioxidantes endógenos (Figura 6), que incluem complexos enzimáticos, como os enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), a glutatio no peroxidase (GPx), glutatio no-S-transferase e ainda existem sistemas não enzimáticos endógenos como a tioredoxina e as metalotioneínas (Carocho & Ferreira, 2013). Estes enzimas endógenos são extremamente importantes pois constituem uma primeira linha de defesa contra radicais como o anião superóxido radical hidroxilo que são moléculas extremamente reativas (Masella *et al.*, 2005; Carocho & Ferreira, 2013).

O sistema enzimático superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) (Figura 7) é responsável pela dismutação de moléculas de superóxido em peróxido de hidrogénio e oxigénio (Figura 7). A catalase (CAT, EC 1.11.1.6) atua decompondo o peróxido de hidrogénio a água (Figura 7), de modo a prevenir que ocorra formação do radical hidroxilo.

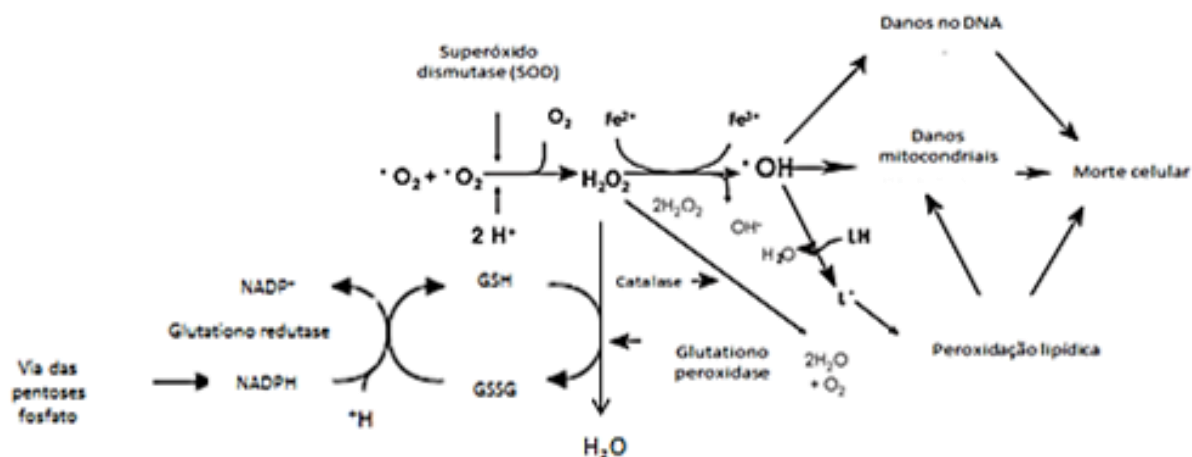


Figura 7- Sistemas enzimáticos antioxidantes (Adaptado de Morón & Castilla-Cortázar, 2012)

O glutatono possui um ciclo próprio, através do qual sofre oxidação e redução. Quando o glutatono sofre oxidação forma-se o GSSG que é posteriormente reduzido pela glutatono redutase, como apresentado na figura 8. Por outro lado, além dos sistemas enzimáticos antioxidantes, também existem defesas contra os radicais livres que são de origem exógena (Figura 7) (Morón & Castilla-Cortázar, 2012).

3.2 Estudos de avaliação da toxicidade

3.2.1 Ensaio de toxicidade aguda

De acordo com a OMS, cerca de 80% da população mundial recorre ao uso de remédios tradicionais provenientes de plantas. De modo a contornar esse facto, a OMS tomou medidas de modo a que os medicamentos provenientes da medicina tradicional fossem utilizados corretamente, visto que existe alguma confusão na utilização correta destes mesmos e que estes possam substituir os medicamentos desenvolvidos quimicamente (Asiedu-Gyekye *et al.*, 2014). As plantas aromáticas são constituídas por diversas moléculas bioativas pelo que a utilização em grande quantidade dos seus óleos ou seus extratos, pode apresentar toxicidade, sendo assim importante desenvolver os estudos toxicológicos *in vitro* e *in vivo* no sentido de avaliar a toxicidade destes produtos e definir um intervalo de referência em que estes possam ser tomados em segurança sem induzir toxicidade (Ezeja *et al.*, 2014).

3.2.1.1 Letalidade em *Artemia salina*

A avaliação preliminar da toxicidade de extratos e óleos essenciais de plantas, através do bioensaio com *Artemia salina* com determinação da CL₅₀ pode dar um contributo importante como teste de *screening* para avaliar a presença de toxicidade de compostos isolados de plantas (Pimentel *et al.*,2011). Este ensaio é relativamente simples e permite de forma rápida, económica e reprodutível obter resultados preliminares sobre a presença de toxicidade ou não de alguns compostos (Pimentel *et al.*,2011; Hirota *et al.*,2012).

3.2.1.2 Avaliação *in vivo* da toxicidade aguda

A avaliação da toxicidade aguda utilizando ratinhos Swiss como modelo animal, permite efetuar um *screening* sobre a toxicidade de alguns compostos com a determinação dos valores da DL₅₀ (dose letal para 50% dos animais teste). Os ensaios de determinação da DL₅₀ devem ser realizados acordo com a norma 425 da OCDE, (*Up and Down*), seguindo também as exigências da Direção Geral de Veterinária e da FELASA, de modo a minimizar o número de animais no ensaio e a reduzir o seu sofrimento (OCDE,2001). Paralelamente, deve ser efetuada a triagem farmacológica (atividade motora, reflexos pineal e de postura, catalepsia, teste de tração e Haffner, piloereção, e condutas passiva, agressiva ou de temor) durante os 14 dias de ensaio. Estes ensaios permitem-nos observar a resposta dos animais a elevadas concentrações da substância em análise e definir uma dose segura bem como avaliar a ação de potenciais fármacos (Akhila *et al.*,2007).

3.2.1.2.1 Avaliação bioquímica da toxicidade hepática

O fígado é um dos órgãos mais importantes e complexos no organismo. Este é extremamente importante devido às suas diversas funções, designadamente metabólica e a circulatória pois grande parte do sangue passa pelo fígado, desintoxicante de xenobióticos, pois a metabolização destes ocorre no fígado e reserva, pois é no fígado que ocorre o armazenamento de reservas energéticas de glicogénio (Smith *et al.*,2005; Burtis *et al.*,2008; McPherson & Pincus,2011).

A avaliação da função hepática, é extremamente importante nos estudos de avaliação da toxicidade aguda, com vista observar possíveis lesões hepáticas, mesmo que assintomáticas, devendo os estudos histológicos ser complementados com a quantificação de biomarcadores importantes para a avaliação desta função. Os hepatócitos (Figura 8), na presença de substâncias que causem dano hepático são responsáveis pela libertação de enzimas, que podem estar aumentados no soro, devido à lesão da membrana celular e/ou outros organitos celulares. Apesar de alguns analitos séricos a determinar não sejam específicos da função hepática, a avaliação das atividades enzimáticas de um conjunto de biomarcadores, poderá dar um contributo muito importante na avaliação da integridade do hepatócito, designadamente a atividade de aminotransferases (aspartato aminotransferase-AST e alanina aminotransferase- ALT), fosfatases alcalinas, 5'nucleotidases e de lactato desidrogenases (Gaw *et al.*,2013).

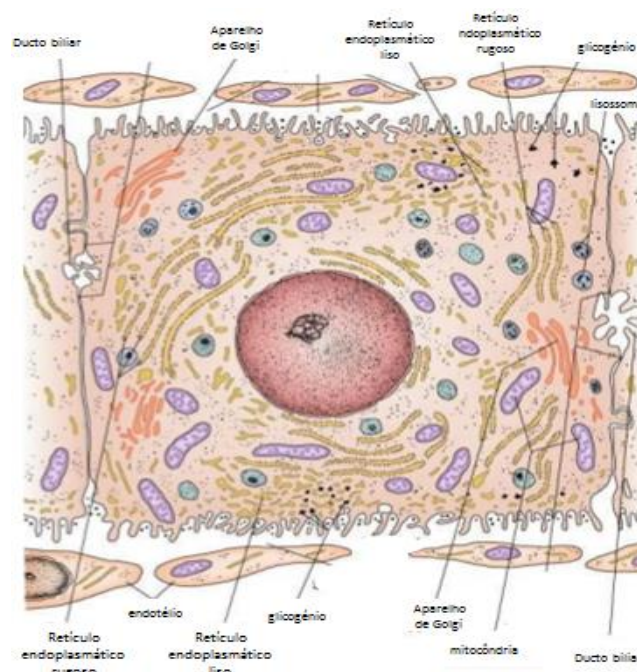


Figura 8- Estrutura do hepatócito (Adaptado de Townsend *et al.*,2012).

As aminotransferases (ALT e AST) são enzimas envolvidas no metabolismo dos aminoácidos, responsáveis por catalisar reações de transaminação com transferência de um grupo amina de um L-aminoácido para um α -acetoácido, com formação de um outro aminoácido, na presença de fosfato de piridoxal (Nelson & Cox,2005).

A alanina é formada a partir do ácido pirúvico através de uma reação de transaminação catalisada pela alanina aminotransferase- ALT (EC 2.6.1.2). Este enzima, catalisa uma reação reversível, sendo responsável pelo transporte de grupos amina e piruvato do músculo para o fígado (Nelson & Cox,2005).

A quantificação de ALT é um dos biomarcadores de monitorização da função hepática, a qual sofre um grande incremento em situações de toxicidade/infeção aguda. Este enzima é citoplasmático, específico do fígado e o seu tempo de meia vida no soro é cerca de 48 horas. Na presença de disfunção hepática os níveis deste enzima aumentam em correlação com outros enzimas, sendo este um excelente biomarcador da disfunção hepática (Smith *et al.*,2005; Burtis *et al.*,2008; Lyons, 2008; McPherson & Pincus,2011).

A aspartato aminotransferase – AST (EC 2.6.1.1) é responsável por catalisar a reação de transaminação entre o ácido α – cetoglutarico e o ácido L- aspártico, com formação de ácido L-glutâmico e de ácido oxaloacético. Apesar deste enzima AST não ser específico do fígado, podendo também encontrar-se em vários tecidos do organismo e em alguns fluídos, pelo que o aumento da sua atividade sérica pode também ocorrer na presença de outras patologias, como as musculares e do miocárdio, a determinação da sua atividade sérica de AST conjuntamente com a do enzima ALT pode ser muito importante na monitorização da função hepática (Burtis *et al.*,2008). A atividade enzimática da AST é normalmente superior à do enzima ALT, com um tempo de meia vida de cerca de 18 horas no soro, sendo este enzima simultaneamente citoplasmático e mitocondrial, podendo assim indicar a presença de uma lesão mais profunda do hepatócito (Burtis *et al.*,2008).

A fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1) é responsável pela hidrólise de pirofosfatos inorgânicos em meio alcalino de um conjunto vasto e variado de substratos, podendo ser encontrada em diversos órgãos, designadamente no fígado, rins e tecido ósseo (Shimizu *et al.*,2013). A avaliação da atividade sérica da fosfatase alcalina em conjunto com as aminotransferases pode ser muito útil na avaliação da toxicidade hepática, embora sempre conjugado com outros biomarcadores, designadamente γ - glutamiltransferase (GGT) e a 5'nucleotidase (Burtis *et al.*,2008; McPherson & Pincus,2011).

A γ -glutamiltransferase (EC 2.3.2.2) é um enzima heterodimérica altamente glicolisada responsável por catalisar a transferência do grupo γ - glutamil a partir de péptidos ou compostos que contenham este grupo com um grupo aceitador. Este, encontra-se na superfície externa das células em vários órgãos, exceto no músculo (Burtis *et al.*,2008; Gaw *et al.*,2013). Este enzima desempenha diversos processos biológicos, designadamente na biossíntese de leucotrienos e na desintoxicação celular de xenobióticos (Singh *et al.*,2013). A atividade sérica desta encontra-se aumentada na presença de disfunções hepáticas e hepatobiliares (Burtis *et al.*,2008).

A 5'nucleotidase é também um biomarcador de função hepática apesar de ser essencialmente um enzima de membrana e se encontrar distribuído em vários organismos. A atividade da 5'nucleotidase está relacionada com disfunções hepatobiliares, não

apresentando alterações na presença de doenças ósseas, nem períodos de crescimento ou gravidez, sendo assim mais específica que a ALP (Burtis *et al.*,2008).

A lactato desidrogenase (EC 1.1.1.27) é também um biomarcador da função hepática e é um enzima responsável por catalisar a oxidação do L-lactato a piruvato na presença de um aceitador de iões de hidrogénio, o NAD⁺ (Burtis *et al.*,2008; McPherson & Pincus,2011). A atividade da lactato desidrogenase está presente em todas as células do organismo, podendo estar elevada no soro na presença de disfunções hepática, renal, do miocárdio e de hemólise, no entanto, para alguns órgãos é possível selecionar isoenzimas mais específicas (Adeva-Andany *et al.*,2014). O enzima LDH encontra-se localizada principalmente no citoplasma e um valor elevado de atividade de LDH, pode indicar disfunções a nível hepático (Adeva-Andany *et al.*,2014).

Na avaliação da função hepatobiliar, para além dos enzimas séricos, pode proceder-se à quantificação de bilirrubina (Burtis *et al.*,2008; McPherson & Pincus,2011). A bilirrubina é um metabolito proveniente do metabolismo do heme, ocorrendo a sua formação quando os eritrócitos entram em senescência (Quintas *et al.*,2008). Na degradação do grupo heme, ocorre a formação de bilirrubina, por redução da biliverdina. A bilirrubina posteriormente conjuga-se com o ácido glucorónico, pois na sua forma livre não é solúvel, sendo posteriormente excretada pela bília (Burtis *et al.*,2008; Gaw *et al.*,2013). Quando ocorrem disfunções hepáticas e biliares, associadas ao metabolismo da bilirrubina, ocorre a acumulação de bilirrubina no sangue (Burtis *et al.*,2008).

3.2.1.2.2 Avaliação bioquímica da toxicidade renal

O sistema renal é um órgão muito importante na manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico do organismo, o principal sistema excretor do organismo, com importantes funções de desintoxicação (Guyton & Hall,2006; Burtis *et al.*,2008; Gaw *et al.*,2013). Estes são constituídos por milhares de nefrônios que são a unidade funcional do rim (Figura 9).

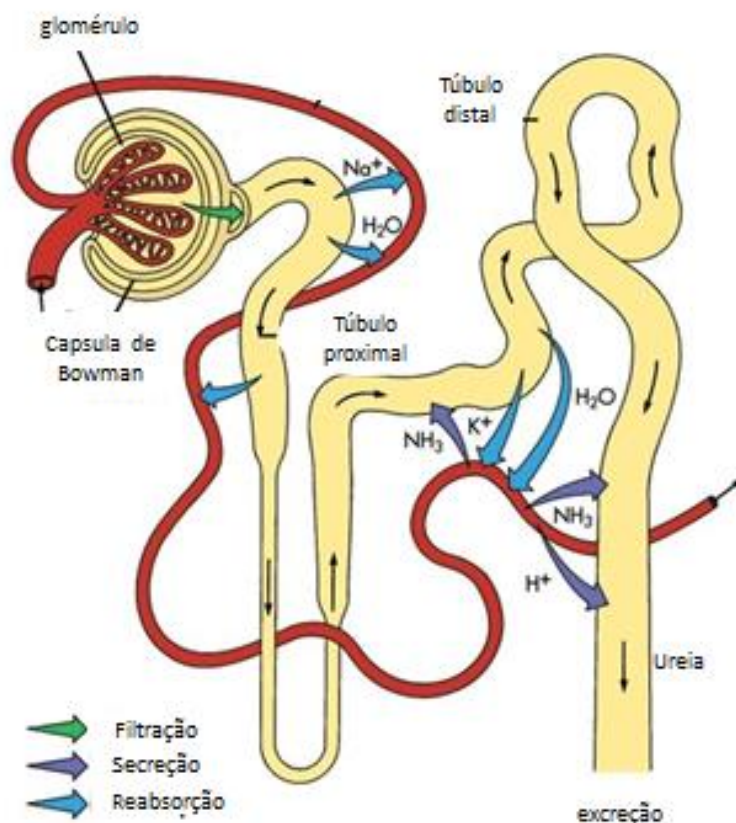


Figura 9- Unidade funcional do rim, nefrônio e o transporte de substâncias neste (Adaptado de Patton & Thibodeau,2012)

A urina, é um fluido que se forma no rim e que permite a excreção de substâncias tóxicas. Em condições normais, a urina apresenta uma coloração amarela-pálida, pH ácido e um odor característico. A urina é formada em três processos, filtração, onde ocorre a passagem não seletiva de moléculas de pequenas dimensões dos capilares glomerulares para os túbulos renais. Reabsorção, pois é através deste que pequenas moléculas são devolvidas seletivamente ao fluido intersticial, secreção, onde as moléculas são adicionadas ao filtrado para serem excretadas (Guyton & Hall,2006; Smith *et al.*,2005; McPherson & Pincus,2011). A nível microscópico, o sedimento urinário poderá conter

fragmentos celulares, compostos dissolvidos e cristais e pode dar um contributo importante no despiste de alterações da função renal. Na análise da função renal para além da análise sumária da urina são geralmente quantificados a creatinina e a ureia séricas e por, vezes também na urina, Com vista à avaliação da função glomerular, procede-se também à avaliação da *clearance* da creatinina (Burtis *et al.*,2008).

A análise sumária da urina permite caraterizar a urina, com avaliação do pH, cor e densidade, bem como detetar a presença de substâncias que não deverão estar presentes na urina, como proteínas, bilirrubina, corpos cetónicos e glucose. A presença destas substâncias na urina, são indicativos de lesão renal, a nível tubular nos rins ou de filtração glomerular, assim como a presença de eritrócitos e leucócitos também pode ser indicador da presença de lesão do nefrónio (Chadwick & Macnab,2015).



A creatinina é um produto da degradação espontânea da creatina, sendo os seus níveis constantes, sendo esta excretada na urina (Quintas *et al.*,2008). A creatinina é sintetizada em diversos órgãos, como por exemplo os rins, o fígado e o pâncreas e constitui apenas uma pequena fração dos componentes presentes na urina ou no plasma sendo assim um importante biomarcador na avaliação da função renal (Burtis *et al.*,2008).

A ureia é proveniente do catabolismo de proteínas e aminoácidos e é excretada pelos rins. A concentração de ureia encontra-se aumentada na presença de disfunção renal, dado que cerca de 90% da ureia é excretada pelos rins, levando frequentemente a um aumento dos níveis séricos de ureia na presença de disfunções (Burtis *et al.*,2008). Contudo, este marcador não é tão específico como a creatinina, pois existem diversos fatores externos, como o aumento do catabolismo de proteínas e estados de desidratação que podem alterar a sua concentração (McPherson & Pincus,2011).

3.3 Plantas aromáticas em estudo

Neste estudo, foram seleccionadas duas espécies de plantas aromáticas autóctones e que são espontâneas e frequentes no Alentejo e utilizadas como condimentos alimentares, designadamente *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* (L.) Savi da família Lamiaceae e *Foeniculum vulgare* Miller da família Apiaceae [1]. No Quadro 1, apresenta-se a classificação taxonómica das plantas aromáticas em estudo.

Quadro 1- Taxonomia das plantas em estudo : *C.nepeta* subsp *nepeta* e *F.vulgare*

Nome vulgar		
	Erva-das azeitonas	Funcho
Reino	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>
Divisão	<i>Spermatophyta</i>	<i>Spermatophyta</i>
Subdivisão	<i>Magnoliophytina</i>	<i>Magnoliophytina</i>
Ordem	<i>Lamiales</i>	<i>Apiales</i>
Família	<i>Lamiaceae</i>	<i>Apiaceae</i>
Género	<i>Calamintha</i>	<i>Foeniculum</i>
Espécie	<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>nepeta</i>	<i>Foeniculum vulgare</i>

3.3.1 *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* (L.) Savi

Calamintha nepeta subsp. *nepeta* (L.) Savi, vulgarmente conhecida como erva-das-azeitonas, nêveda ou calamintha (Figura 10) é uma planta espontânea, dispersa geograficamente por toda a península Ibérica, frequente em sítios secos, sebes, taludes e orlas de sobreirais, azinhais, soutos, pinhais, carrascais e olivais [1].

O género *Calamintha*, pertencente a família Lamiaceae e é conhecido pela sua utilização na medicina popular como digestivas, expetorantes, antiespasmódico e

carminativo e os seus óleos essenciais são conhecidos por terem atividades antimicrobianas e antifúngica (Negro *et al.*,2013).



Figura 10- *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp *nepeta*, Herdade da Mitra, Évora

Na literatura existem alguns estudos com *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp *nepeta*, a maioria dos quais sobre a composição química dos OEs desta planta. Baldovini *et al.*,1999, realizou um estudo em Corsica, França, onde pretendeu observar a variabilidade da composição química do OE desta planta colhidas em diferentes localizações geográficas. Galego *et al.*,2006 e Miguel *et al.*,2006, realizaram estudos de composição química e atividades antioxidantes com OEs provenientes do sul de Portugal. Marongiu *et al.*,2010 no seu estudo analisou a composição química deste OE proveniente de Itália e Portugal, de modo a observar se existia variabilidade na composição química, consoante a zona geográfica. Pacífico *et al.*,2015, realizou estudos de atividade antioxidante e anti-inflamatória com extratos de *C.nepeta*.

3.3.2 *Foeniculum vulgare* Miller

Foeniculum vulgare Miller é uma espécie pertencente à família Apiaceae. Esta é nativa da região do mediterrâneo, conhecida por funcho ou erva-doce (Barros *et al.*,2010). Esta coloniza baldios e incultos em sítios secos, podendo atingir grandes densidades e originar funchais, ocorrendo também em clareiras de matos degradados, bermas de caminhos e campos de cultivo [1]. Na Figura 11, apresenta-se uma imagem de funcho. Este, é uma planta aromática com um sabor característico a anis e várias partes desta planta, desde caules a folhas tem sido vastamente utilizados na medicina tradicional para tratamento de desordens do sistema digestivo (Barros *et al.*,2010).



Figura 11- *Foeniculum vulgare* Miller

Esta planta pode crescer até 2,5 m de altura e as folhas podem crescer até 40 cm (Barros *et al.*,2010). Existem duas variedades distintas, o funcho doce, que é a planta em estudo e o funcho amargo. O funcho, é uma planta muito aromática com diversas aplicações quer na culinária, como conservante ou condimento alimentar, quer devido às suas propriedades medicinais (Cunha *et al.*,2007; Rather *et al.*, 2012).

O óleo essencial de funcho possui diversas propriedades farmacológicas, desde atividade antibacteriana, antioxidante, antifúngica, antitrombótica, anti-inflamatória, hepatoprotetora e antidiabética (Rather *et al.*, 2012).

As sementes de funcho são utilizadas como condimentos alimentares em diversos pratos, quer de peixe quer de carne (Rather *et al.*, 2012). O óleo essencial de funcho é conhecido pelo seu aroma intenso, devido à presença de anetol, fenchona, estragol e o α -felandreno como componentes maioritários (Figura 12).

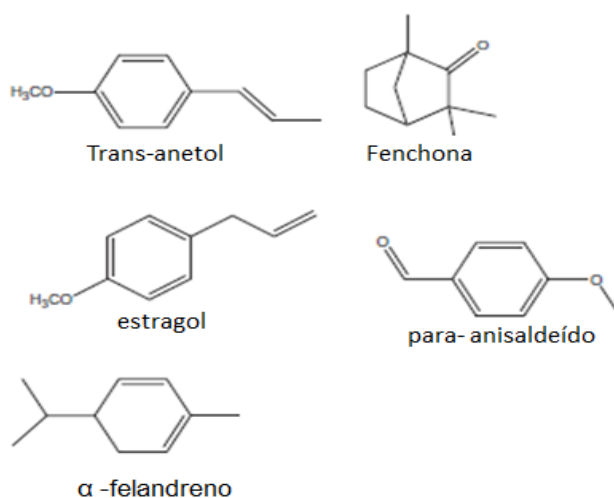


Figura 12- Componentes maioritários do óleo essencial de funcho (Adaptado de Rather *et al.*,2012)

Na literatura existem diversos estudos com OEs e extratos de funcho, com diversas partes desta planta, maioritariamente sementes e frutos. Existem diversos estudos realizados com OE de funcho, que avaliaram a composição química deste OE (Anwar *et al.*,2009;Telci *et al.*,2009; Pasirija *et al.*,2011; Roby *et al.*,2013; Khalid *et al.*,2014). Existem também alguns estudos de atividade antioxidante com extratos de funcho em que estes revelam importantes propriedades antioxidantes (Oktay *et al.*,2003; Anwar *et al.*,2009; Ebeed *et al.*,2011; Badgujar *et al.*,2014)

Além dos estudos de atividade antioxidante, existem outros estudos que avaliam as propriedades hepatoprotetoras do OE de funcho em estudos de hepatotoxicidade (Ozbek *et al.*,2003; Rabeh & Aboraya,2014) e nefroprotetoras em estudos de nefrotoxicidade (Shaheen *et al.*,2014).

4. Materiais e métodos

4.1 Seleção e preparação das plantas

Para este estudo foram selecionadas duas espécies de plantas aromáticas autóctones na região Alentejo, *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* (L.) Savi e *Foeniculum vulgare* Miller. Procedeu-se à recolha da parte aérea de plantas espontâneas, na Herdade da Mitra (Évora). A colheita de *C.nepeta* foi efetuada durante a fase de floração (Outubro 2013) e a de *F.vulgare* na fase de planta verde (Março 2013) As plantas foram identificadas pela Prof^a Marízia Pereira e um exemplar de cada espécie foi depositada no Herbário de Plantas Aromáticas da Universidade de Évora.

O material vegetal foi separado e seco num local escuro e isento de humidade, triturado e alíquotado. As alíquotas foram conservadas a -20°C para extração dos óleos essenciais.

4.2 Obtenção dos óleos essenciais e extratos aquosos

Os óleos essenciais de *C.nepeta* (parte aérea em floração) e de *F.vulgare* (folha verde) foram obtidos por hidrodestilação num sistema tipo *Clevenger*, no qual a extração foi efetuada pela técnica de hidrodestilação durante 3 horas de acordo com a (Farmacopeia Portuguesa, 2008). Após a extração dos óleos essenciais procedeu-se à determinação do rendimento de extração e os óleos foram armazenados a - 20°C. As águas de decocção (obtidas após hidrodestilação) foram filtradas e posteriormente liofilizadas de forma a obter os extratos aquosos liofilizados. Procedeu-se à caracterização do óleo essencial com determinação da densidade e do índice de refração.

4.3 Análise da composição química dos óleos essenciais por cromatografia gasosa (GC)

A análise da composição química dos óleos essenciais foi por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID), num cromatógrafo GC-HP 5890 Series II. A fase estacionária utilizada foi uma coluna polar SUPELCOWAXTM 10 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) e a fase móvel foi constituída por hélio como gás de arraste, com um fluxo de 0,6 mL/min e razão de *split* de 50:1. Para separação dos óleos essenciais programou-se um gradiente de temperatura de 70°C (3 min), 70°C-220°C (3°C/min) e 220°C (5 min) e

ajustou-se a temperatura do injetor e do detetor para 250°C. O volume injetado foi 0.2 µL de óleo puro. As análises de cada uma das amostras foram efetuadas em triplicado. A quantificação dos componentes dos óleos essenciais foi determinada pelo método de normalização interna com base na área dos picos sem correção de fator de resposta. A identificação dos componentes foi efetuada por comparação dos respetivos índices de retenção (IR), calculados em relação a uma série homóloga de *n*-alcanos de C₈-C₂₀, (Sigma Aldrich) com os de padrões puros ou mencionados na literatura e confirmados pelo método da adição padrão (Cavaleiro *et al.*,2004; Mottram,2007).

4.4 Caraterização química dos extratos aquosos

4.4.1 Pesquisa fitoquímica

Para a caraterização química dos extratos aquosos, recorreram-se a protocolos de pesquisa fitoquímica para a realização de vários testes de modo a avaliar a presença de compostos bioativos nos extratos aquosos em estudo. (Matos,1997; Anyasor *et al.*,2010; Benmehdi *et al.*,2012). Para os extratos aquosos foi preparada uma solução de 1 mg/mL. Posteriormente foram preparadas várias alíquotas de 1 mL e uma alíquota de 5 mL em tubos de ensaio para cada extrato, para pesquisa de fenóis e taninos, antocianinas, antocianidinas e flavonóides, catequinas e flavonas, esteróides e triterpenóides, cumarinas, saponinas, alcalóides e oses e polioses (Anyasor *et al.*,2010; Benmehdi *et al.*,2012).

Na análise por pesquisa fitoquímica foram efetuados os seguintes testes:

- **Pesquisa de fenóis e taninos:** A cada alíquota de extrato foram adicionadas 3 gotas de solução alcoólica de cloreto férrico (FeCl₃) 1%. Para comparação foi preparado um branco contendo esse apenas solvente e a solução de cloreto férrico. Uma coloração variável entre o azul e o vermelho é indicativo da presença de fenóis. A formação de precipitado escuro de tonalidade azul é indicativo da presença de taninos pirogálicos.

- **Pesquisa de antocianinas, antocianidinas e flavonoides:** Neste teste foram preparadas 3 alíquotas de extrato. Uma foi acidulada a pH=3, outra alcalinizada a pH 8,5 e a terceira alcalinizada a pH=11. Na solução a pH=3, observou-se o aparecimento de coloração vermelha na presença de antocianidinas. Na solução a pH=8,5, a coloração lilás é indicativa da presença de antociadinas. Na solução a pH=11 a coloração púrpura é indicativa da presença de antocianinas e antocianidinas enquanto

que a coloração amarela indica a presença de flavonas e a coloração vermelho-laranja a presença de flavanonois.

- **Pesquisa de catequinas e flavanonas:** Uma das soluções de teste foi acidulada a pH=3 e a outra alcalinizada a pH=11. Os tubos foram aquecidos durante cerca de 2-3 minutos. O aparecimento de coloração amarelada em meio ácido é indicativo da presença de catequinas e de coloração vermelho-laranja em meio alcalino indica a presença de flavanonas.

- **Pesquisa de flavonois, flavonas, flavanonois e xantonas:** Numa alíquota de solução de extrato foram adicionados alguns centigramas de magnésio granulado e posteriormente adicionaram-se algumas gotas de HCl concentrado. O aparecimento ou intensificação de uma coloração vermelha é indicativo da presença destes compostos.

- **Teste de confirmação da presença de catequinas:** Para este teste utilizou-se um palito que foi humedecido na alíquota de extrato e posteriormente em HCl concentrado. Este foi aquecido ao calor da chama de álcool durante cerca de 2-3 minutos. Após aquecimento, a observação de uma coloração avermelhada é indicativo da presença de catequinas.

- **Pesquisa de flavonóides:** Uma alíquota de extrato em análise foi adicionada a um volume igual de NaOH 0,1M. Após homogeneização, a observação de uma coloração amarela é indicativo da presença de flavonóides.

- **Pesquisa de esteroides e triterpenóides:** Prepararam-se cerca de 10 mg de extrato que foram extraídas 2-3 vezes com 1 mL de clorofórmio. A solução clorofórmica foi extraída gota a gota num pequeno funil fechado com uma bolinha de algodão coberta com alguns decigramas de sulfato de sódio anidro. Após a extração foram adicionados 1 mL de anidrido acético e 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento de coloração verde indica a presença de esteroides livres, enquanto que o aparecimento de uma coloração vermelha indica a presença de triterpenóides pentacíclicos livres.

- **Pesquisa de cumarinas:** Num papel de filtro foram colocadas duas gotas de extrato. Numa das gotas colocou-se uma gota de KOH e observou-se com auxílio de uma lâmpada UV. Se ocorrer a presença de fluorescência azul-esverdeada na qual se adicionou KOH, isto é indicativo da presença de cumarinas.

- **Pesquisa de saponinas:** O tubo de ensaio contendo a alíquota de 5 mL, foi agitado vigorosamente durante 15 segundos. A formação de uma coluna de espuma consistente durante cerca de 15 minutos é indicativa da presença de saponinas.

- **Teste para alcalóides:** Uma alíquota de 0,5 g de extrato foi adicionada a 5mL de HCl 1%. Após agitação e filtração, adicionou-se água destilada ao resíduo. Esta solução, foi alíquota a 3 tubos de ensaio (1mL), aos quais foram adicionados de 3 gotas dos reagentes Hager, Mayer e Drangendorff respetivamente. A observação da formação de precipitado é característica da presença de alcalóides.

- **Teste para oses e polioses:** Num tubo de ensaio contendo extrato aquoso adicionaram-se 2 gotas de reagente de Molish e agitou-se. Após isto adicionaram-se 2 mL de ácido sulfúrico concentrado muito lentamente junto à parede do tubo. O aparecimento de uma coloração púrpura indica a presença de oses e /ou polioses.

4.4.2 Quantificação dos fenóis totais

Para a quantificação do teor em fenóis totais presentes neste compostos, utilizou-se o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Oliveira *et al.*,2009). O reagente de Folin-Ciocalteu é constituído pela mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico e o molibdénio encontra-se no estado de oxidação (VI) apresentando coloração amarela (Figura 13). Na presença de agentes redutores, como é o caso dos compostos fenólicos, ocorre a formação de complexos de molibdénio-tungsténio de coloração azul, permitindo assim a sua quantificação por espectrometria (Oliveira *et al.*,2009).

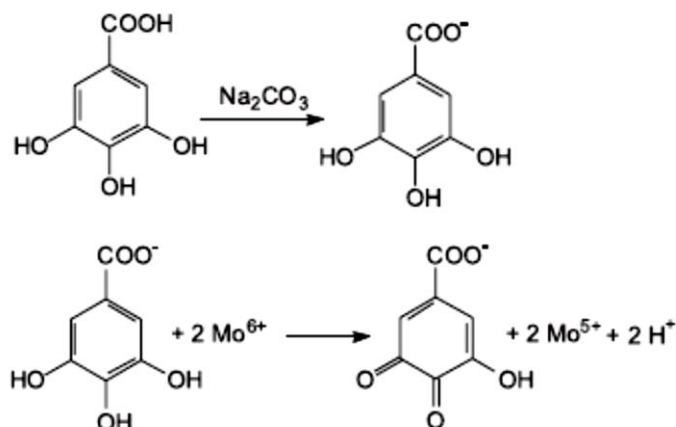


Figura 13 - Reação do ácido pirogálgico com o molibdénio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu (Adaptado de Oliveira *et al.*,2009).

Para a quantificação dos fenóis totais, foram preparadas diversas concentrações de extratos aquosos, entre 8,3 e 530 µg/mL. O ácido pirogálico foi utilizado como padrão, nas concentrações entre 0,2 e 4 µg/mL. Foram preparados dois brancos, um com água para os extratos aquosos e outro com etanol para o padrão. O ensaio foi realizado em microplaca e a 235 µL de água destilada adicionou-se 5 µL de amostra/padrão e 15 µL reagente de Folin-Ciocalteu. Após homogeneização adicionaram-se 45 µL de solução saturada de carbonato de sódio. Após incubação das placas a 40°C durante 30 minutos, procedeu-se à leitura da absorvância a 630nm. Para cada uma das soluções/padrões em análise foram efetuadas 6 réplicas.

4.4.3 Quantificação dos flavonóides totais

A quantificação dos flavonóides totais foi efetuada recorrendo a um método colorimétrico utilizando o cloreto de alumínio (Singla *et al.*,2011). Na presença de Al^{3+} ocorre a formação de um complexo flavonóide-alumínio estável (Figura 14) com capacidade para absorver a 490nm, permitindo assim a sua quantificação (Pallab *et al.*,2013).

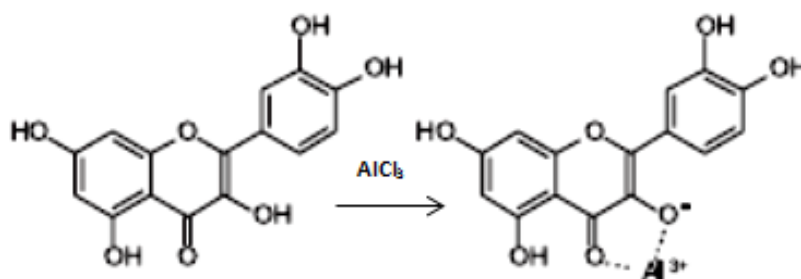


Figura 14 - Formação do complexo alumínio-flavonóide (quercetina) (Adaptado de Frederice *et al.*,2010)

Para quantificação dos flavonóides totais, foram preparadas concentrações de extrato aquoso (125-615 µg/mL), utilizando-se a quercetina como padrão (6-1000 µg/mL). Alíquotas de 100 µL foram adicionadas a volumes iguais de solução de $AlCl_3 \cdot H_2O$ 2%, sendo a mistura agitada vigorosamente e após incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente, a absorvância foi lida a 490nm (Deng *et al.*,2012). O ensaio realizou-se em sextuplicado.

4.5 Avaliação da atividade antioxidante

Para a avaliação das propriedades antioxidantes, escolheram-se três métodos com três mecanismos diferentes: método da redução do radical DPPH, β -caroteno/ácido linoleico e poder redutor total de modo a avaliar os mecanismos de atividade dos óleos essenciais e extratos em análise.

4.5.1 Método do radical DPPH

Alguns compostos, ou extratos de plantas possuem a capacidade de doar átomos de hidrogénio (Tepe *et al.*,2007). O radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil é um radical estável de coloração púrpura. Na presença de substâncias antioxidantes, este radical sofre redução, devido à transferência de átomos de hidrogénio (Figura 15) (Amorati *et al.*,2013).

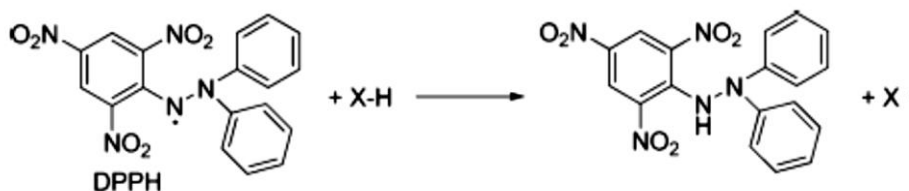


Figura 15- Reação de redução do radical DPPH na presença de espécies antioxidantes (Adaptado de Amorati *et al.*,2013).

Para avaliação da atividade antioxidante, prepararam-se soluções etanólicas de cada óleo essencial (1200-5000 $\mu\text{g/mL}$) em tween 20 a 5% (v/v) e soluções aquosas de extrato aquoso (3,9-520 $\mu\text{g/mL}$). Como padrões, foram utilizados a quercetina (0,8-26 $\mu\text{g/mL}$) e o ácido ascórbico (1-32 $\mu\text{g/mL}$).

A avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais foi adicionando 100 μL de amostra/padrão a 1 mL de solução etanólica DPPH 0,1 mM. As amostras foram agitadas e incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente na ausência de luz. Preparou-se 1 ensaio em branco substituindo a solução do óleo por etanol com tween 20 a 5%. Os ensaios foram efetuados em triplicado. A avaliação da atividade antioxidante dos extratos aquosos foi efetuada em microplaca, tendo-se colocado 30 μL de amostra/padrão e posteriormente adicionado 200 μL de solução etanólica de DPPH 0,1 mM. As amostras

A avaliação da atividade antioxidante, pelo método β -caroteno/ácido linoleico é determinada avaliando a capacidade de inibição desta reação de oxidação na presença de compostos orgânicos. Na presença de compostos antioxidantes, estes retardam a oxidação do ácido linoleico (Sarikurku *et al.*, 2009).

Uma solução stock de β - caroteno/ácido linoleico, foi preparada dissolvendo 0,5 mg de β -caroteno em 1 mL de clorofórmio e posteriormente adicionando 25 μ L de ácido linoleico e 200 mg de Tween 40. A solução foi colocada no rotavapor de modo a evaporar completamente o clorofórmio. Posteriormente adicionaram-se cerca de 100 mL de água saturada de oxigénio e homogeneizou-se a mistura por agitação vigorosa e ajustou-se o valor da absorvância (490nm) entre 0,6-0,7 (Sarikurku *et al.*, 2009).

Para avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais foram preparadas soluções etanólicas com Tween 20 a 5%, por diluição sucessiva (30-2000 μ g/mL) a partir de uma solução mãe de 2000 μ g/mL. Num tubo de ensaio colocaram-se 350 μ L de amostra/padrão os quais foram adicionados 2,5 mL de solução stock de β -caroteno/ácido linoleico, previamente preparada. A quercetina e o ácido ascórbico foram utilizados como padrão, tendo-se preparado soluções etanólicas seriadas de quercetina (1,5-25 μ g/mL) e de ácido ascórbico (60-4000 μ g/mL). Preparou-se um ensaio em branco em que a solução de óleo essencial foi substituída por solução etanólica com Tween 20 a 5%. Os tubos foram homogeneizados e a leitura da absorvância (t_0) foi lida a 490nm. Em seguida procedeu-se à incubação das soluções durante 2 horas a 50°C. Após incubação, procedeu-se novamente à leitura da absorvância a 490nm (t_1) (Tepe *et al.*, 2007).

Para a quantificação da atividade antioxidante dos extratos prepararam-se soluções aquosas, por diluição sucessiva a partir da solução de 250 μ g/mL (1-250 μ g/mL). A quercetina e o ácido ascórbico foram utilizados como padrão, tendo-se preparado soluções etanólicas seriadas de quercetina (1,5-25 μ g/mL) e de ácido ascórbico (60-4000 μ g/mL). Os ensaios foram efetuados em microplaca nos quais 35 μ L de amostra/padrão foram adicionados, seguidamente de 250 μ L de solução stock de β -caroteno/ácido linoleico. Preparou-se um ensaio em branco, no qual a solução de extrato foi substituída por água bidestilada. Os ensaios foram efetuados em sextuplicado. Procedeu-se à leitura da absorvância da microplaca a 490nm após a adição da solução stock de β -caroteno/ácido linoleico (t_0) e 2 horas após a incubação (t_1).

A atividade antioxidante foi determinada pela fórmula:

$$I (\%) = \frac{\Delta A_{490} (branco) - \Delta A_{490}(amostra)}{\Delta A_{490}(branco)} \times 100$$

Os valores de ΔA correspondem à diferença entre os valores de absorvância logo após a adição da solução stock (t_0) e os valores de absorvância após 2 horas de incubação (t_1).

4.5.3 Método do poder redutor

O método do poder redutor foi descrito pela primeira vez por Oyazu (1986) e permite avaliar a capacidade antioxidante dos óleos essenciais e extratos para reduzirem o Fe^{3+} e inferir sobre a sua capacidade para proteção do grupo Heme (Dutta & Maharia.,2012). A capacidade de uma substância sofrer redução pode dever-se ao facto de este apresentar características antioxidantes (Karawita *et al.*, 2005).

Na Figura 17 apresenta-se um esquema do mecanismo observado na presença de espécies com potencial redutor, as quais reagem com o ferricianeto de potássio com formação de um complexo ferroso que têm o seu máximo de absorção a 700nm (Ferreira *et al.*,2007;Jayanthi & Lalitha,2011).

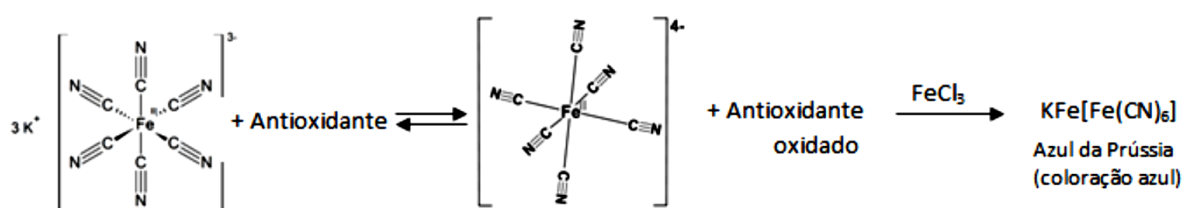


Figura 17- Reação de redução do Fe (III) a Fe (II) na presença de substâncias antioxidantes (Adaptado de Jayanthi & Lalitha, 2011).

Para avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais foram preparadas soluções etanólicas com tween 20 a 5%, por diluição sucessiva (125-2000 $\mu\text{g/mL}$) a partir de uma solução mãe de 4000 $\mu\text{g/mL}$. Para os extratos aquosos foram preparadas soluções aquosas por diluições seriadas (0,2-120 $\mu\text{g/mL}$) a partir de uma solução de 240 mg/mL . O BHT e o ácido ascórbico foram utilizados como padrão, tendo-se preparado soluções etanólicas seriadas de BHT (1-155 $\mu\text{g/mL}$) e de ácido ascórbico (0,9-39 $\mu\text{g/mL}$). Preparou-se um ensaio em branco em que a solução de óleo essencial foi substituída por solução etanólica com Tween 20 a 5%. Num microtubo de centrífuga adicionou-se 50 μL de Tween 20, seguido de 200 μL de amostra, 200 μL de tampão fosfato 200 mM pH 6.6 e 200 μL

ferricianeto de potássio (III) 1%, para os OEs. Para os extratos aquosos substitui-se os 50 µL de tween por água bidestilada e para os padrões por etanol, tendo o restante procedimento sido efetuado nas mesmas condições.

As amostras/padrões foram incubadas 20 minutos a 50°C, após os quais foram adicionados 200 µL de ácido tricloroacético 10 % e centrifugadas posteriormente 10 minutos a 3000 rpm. Após centrifugação, num microplaca são adicionados 50 µL de sobrenadante, seguidos de 50 µL de H₂O bidestilada e 100 µL de cloreto de ferro (III). A absorvância foi lida a 700nm (Ferreira *et al.*,2007). A avaliação da atividade antioxidante pelo método do poder redutor baseia-se na relação entre o aumento da absorvância e a presença de uma coloração do complexo formado entre o verde e azul da prússia o qual é indicativo de um maior poder redutor. O valor do IC₅₀ de uma amostra é calculado com base na concentração de amostra que corresponde a um valor de absorvância de 0,5 (Ferreira *et al.*,2007).

4.6 Avaliação da toxicidade em *Artemia salina*

A toxicidade dos óleos essenciais e extratos aquosos foi avaliada através do bioensaio de determinação da letalidade de *Artemia salina* de acordo com o protocolo Artoxkit MTM, com algumas modificações. Os ovos de *A.salina* devem ser colocados a eclodir em solução salina a 25 °C durante 24 horas no escuro. Após isso, as larvas devem ser transferidas para uma nova solução salina e novamente incubadas durante 24 horas antes da realização do ensaio (Déciga-Campos *et al.*,2007).

No ensaio de letalidade dos óleos essenciais efetuaram-se diluições seriadas de cada um dos óleos em estudo em solução etanólica contendo DMSO 10% (5-1000 µg/mL), tendo sido também efetuado o estudo com soluções padrão de K₂CrO₇ (100-1000 µg/mL) em solução aquosa contendo DMSO 10%. No ensaio de *A.salina* dos extratos aquosos prepararam-se soluções aquosas dos extratos em estudo (100-10000 µg/mL). Efetuou-se também o estudo de letalidade com soluções padrão de K₂CrO₇.

O ensaio foi realizado adicionando a 900 µL de água do mar sintética 100 µL de amostra, no qual após 24 horas as placas foram observadas utilizando um microscópio (Olympus SZX9) e determinou-se a concentração letal para 50 % da população (CL₅₀) que através da Curva Dose-Resposta, recorrendo ao programa *Origin* 8.

4.7 Avaliação da toxicidade «*in vivo*»

A avaliação da toxicidade é muito utilizada na área das plantas medicinais na avaliação preliminar da toxicidade de extratos e óleos essenciais de plantas (Pimentel *et al.*,2011). Na avaliação das propriedades toxicológicas, foi determinada a DL₅₀ em ratinhos Swiss, após administração oral dos óleos essenciais de *C.nepeta* e *F.vulgare*, de acordo com as normas OECD- procedimento padrão «*Up and Down*» (OECD,2001) com avaliação do screening farmacológico, com avaliação dos parâmetros comportamentais como catalepsia, reflexos posturais, reflexo pineal, teste de sensibilidade na cauda e atividade motora (passiva, agressiva, medo) (Vogel & Vogel,2002). A determinação da DL₅₀ foi determinada recorrendo ao programa “AOT425StatPgm.” (OECD,2001).

A avaliação da toxicidade após administração *per os* dos óleos essenciais de *C.nepeta* (250,500 e 1000 mg/kg) e de *F.vulgare* (500,1000 e 2000 mg/kg) foi também avaliada em ratos Wistar (OECD,2001). Para o efeito, sete grupos cada um com seis ratos Wistar (150-200g) foram administrados com óleo essencial ou com veículo (solução salina contendo Tween 20 a 1%). Os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum* e colocados em jejum 16 horas antes do ensaio. O manuseamento foi efetuado por um investigador credenciado pela Direção Geral de Veterinária e pela FELASA, seguindo as recomendações do comité de Ética (HauSchapiro,2003). No final do ensaio, procedeu-se à recolha dos soros, para posterior quantificação das atividades aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP), para monitorização da função hepática e quantificação de ureia e creatinina séricas para monitorização da função renal. Para despiste de alterações da função renal procedeu-se também à análise sumária da urina (Combur test ®) e procedeu-se à quantificação da ureia e da creatinina na urina dos diferentes dias de ensaio, com determinação do valor de *clearance* da creatinina no final do ensaio (14º dia).

4.7.1 Avaliação bioquímica da toxicidade hepática

Para a avaliação da toxicidade hepática, procedeu-se à determinação das atividades enzimáticas ALT, AST e ALP nos soros dos animais administrados com OE e dos grupos controlo. As quantificações destes biomarcadores foram efetuadas através de kits comerciais da *Sentinel diagnostics*. Procedeu-se à construção de uma curva de calibração utilizando diferentes diluições de um padrão comercial de concentração conhecida (Calibrador, Sentinel). Os valores de atividade enzimática das amostras foram determinados por interpolação gráfica nas respetivas curvas de calibração. Na validação

dos resultados, utilizaram-se dois controlos comerciais, C1 e C2 (*Sentinel Diagnostics*) com intervalos de referência tabelados.

4.7.1.1 Aspartato aminotransferase (AST) (EC 2.6.1.1)

A AST catalisa a reação de transaminação entre o ácido α -cetoglutarico e o ácido L-aspartico, com formação de ácido L-glutâmico e ácido oxaloacético (Figura 18). O ácido oxaloacético formado, na presença de malato desidrogenase reage com o β -NADH₂, formando ácido láctico e β -NAD na mesma proporção. A determinação de $\Delta A/\text{min}$ a 340nm é proporcional à atividade enzimática de AST.

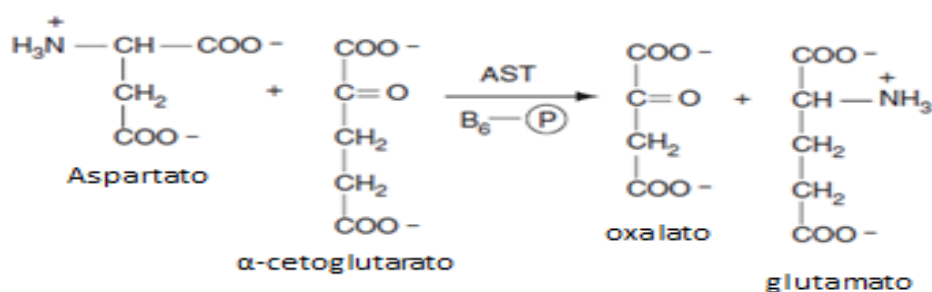


Figura 18- Reação de transaminação catalisada pela Aspartato aminotransferase (Adaptado de McPherson & Pincus, 2011)

Numa cuvette de espectrofotómetro ($l=1\text{cm}$) colocaram-se 440 μL de reagente 1, o qual incubou durante 3 minutos (180 segundos) a 37°C, a qual posteriormente adicionou-se 40 μL de amostra/controlos/padrão. Deixou-se incubar durante 1 minuto (60 segundos) a 37°C. Iniciou-se a reação com a adição de 60 μL de reagente 2 e a absorvância foi lida durante 3 minutos.

4.7.1.2 Alanina aminotransferase (ALT) (EC 2.6.1.2)

A ALT catalisa a reação de transaminação entre o ácido α -cetoglutarico e a L-alanina, ocorrendo a formação de ácido L-glutâmico e ácido pirúvico (Figura 19).

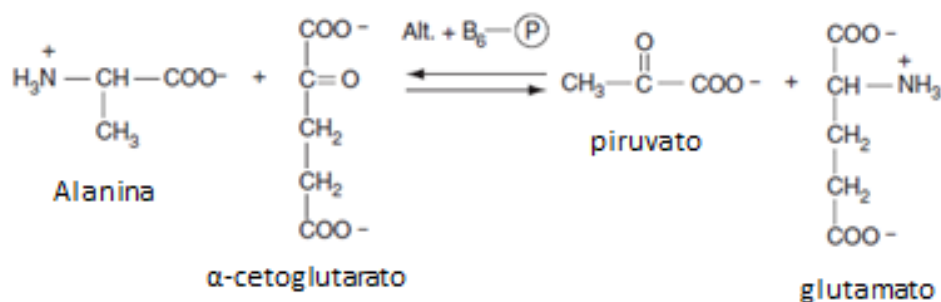


Figura 19 - Reação de transaminação catalisada pela alanina aminotransferase (Adaptado de McPherson & Pincus, 2011).

O ácido pirúvico formado na presença de lactato desidrogenase reage com o β-NADH₂ com a formação de β-NAD e ácido láctico na mesma quantidade. A variação da absorvância a 340 nm por unidade de tempo, permite determinar a atividade enzimática nas amostras em análise. Numa cuvette 1 mL (l=1cm) colocaram-se 440 μL de reagente 1, os quais se incubaram durante 3 minutos (180 segundos) a 37°C e posteriormente adicionou-se 40 μL de amostra/controles/calibrador e deixou-se incubar durante 1 minuto (60 segundos). Iniciou-se a reação com a adição de 60 μL de reagente 2 e a absorvância foi lida durante 3 minutos.

4.7.1.3 Fosfatase alcalina (ALP) (EC 3.1.3.1)

A ALP é responsável por catalisar a hidrólise do 4-nitrofenilfosfato em meio alcalino com a formação de p-nitrofenol e fosfato (Figura 20). Ao medir a variação da absorvância a 415 nm num intervalo de tempo permite determinar a atividade enzimática na amostra em estudo.



Figura 20- Reação catalisada pela fosfatase alcalina (Adaptado de McPherson & Pincus, 2011)

Numa cuvette de 1 mL colocaram-se 400 μ L de reagente 1, o qual ficou a incubar durante 3 minutos (180 segundos), posteriormente adicionou-se 8 μ L de amostra/controles/calibrador, deixou-se incubar durante 1 minuto (180 segundos). A reação iniciou-se com 100 μ L de reagente 2 e a absorvância foi lida durante 3 minutos.

4.7.2 Avaliação bioquímica da toxicidade renal

Para a monitorização da função renal procedeu-se à análise sumária da urina (Combur Test®) e à determinação das concentrações de ureia e creatinina nos soros dos animais administrados com OE e dos grupos controlo. As quantificações destes biomarcadores foram efetuadas através de kits comerciais da *Sentinel diagnostics*. Procedeu-se à construção de uma curva de calibração utilizando diferentes diluições de um padrão comercial de concentração conhecida (Calibrador, Sentinel). As concentrações de ureia e de creatinina nas amostras foram determinadas por interpolação gráfica nas respetivas curvas de calibração. Na validação dos resultados, utilizaram-se dois controlos comerciais, C1 e C2 (*Sentinel Diagnostics*) com intervalos de referência tabelados.

Procedeu-se também à quantificação da ureia e da creatinina na urina nos diferentes dias de ensaio, com determinação do valor de *clearance* da creatinina no final do ensaio.

4.7.2.1 Análise sumária da urina ou Urina tipo II

A análise sumária da urina é um teste simples que permite-nos medir ou observar alguns constituintes que possam estar ou não presentes na urina que permitam avaliar quer a nível das funções hepáticas e renais, quer a presença de desordens metabólicas. Para a análise sumária da urina utilizou-se o Combur Test®, no qual diversos parâmetros foram analisados (gravidade, pH, , glucose, bem como a presença de alguns compostos, nomeadamente: leucócitos, nitritos, corpos cetónicos, uribilinogénio, bilirrubina e sangue). Foram recolhidas diariamente as urinas dos animais administrados com óleo essencial de calaminta e funcho, após as recolhas das urinas, uma tira do Combur Test® foi inserida no recipiente contendo a urina de 24 horas, de modo a que toda a tira ficasse imersa. Após isto, observou-se se ocorreu ou não a alteração de coloração em comparação com a escala padrão do Combur Test®.

4.7.2.2 Creatinina

Na presença de uma solução alcalina, a creatinina forma um complexo colorido ao reagir com o ácido pícrico (Figura 21).

A absorvância do complexo formado a 505 nm é proporcional à concentração de creatinina presente na amostra em estudo.

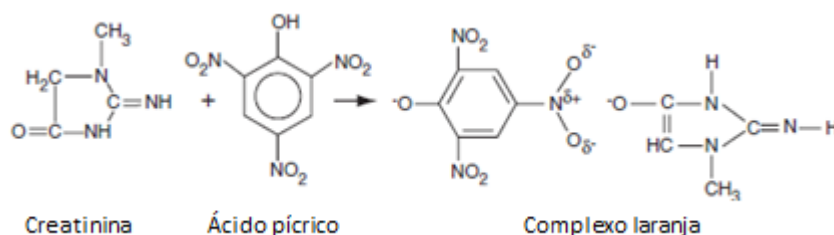


Figura 21- Quantificação de creatinina (Adaptado de McPherson & Pincus, 2011)

Numa cuvette de 1 mL (l=1cm) colocaram-se 250 µL de reagente 1, o qual se incubou durante 3 minutos (180 segundos) a 37°C, ao qual posteriormente se adicionaram 40 µL de amostra/controles/padrão e deixou-se incubar durante 1 minuto (60 segundos), após o qual se adicionou 250 µL de reagente 2 e a absorvância foi lida durante 3 minutos (180 segundos).

Para a quantificação da creatinina na urina, efetuaram-se diluições de 1:50.

4.7.2.3 Clearance da Creatinina

A determinação da clearance da creatinina permitiu-nos avaliar a taxa de filtração glomerular. Este parâmetro foi determinado de acordo com a fórmula seguinte:

$$\text{Clearance da creatinina} = \frac{[\text{Creatinina}]_{\text{urina}} \text{ (mg/dL)}}{[\text{Creatinina}]_{\text{soro}} \text{ (mg/dL)}} * \frac{\text{Volume urina 24h (mL)}}{1440 \text{ minutos}}$$

4.7.2.4 Ureia

A ureia é hidrolisada pela urease em dióxido de carbono e amoníaco (Figura 22). A amónia formada na presença de glutamato desidrogenase que reage com o α -cetoglutarato e o β -NADH₂ com formação de β -NAD em quantidades equivalentes à de ureia hidrolisada. A leitura de absorvância a 340nm num intervalo de tempo permite determinar a concentração de ureia.

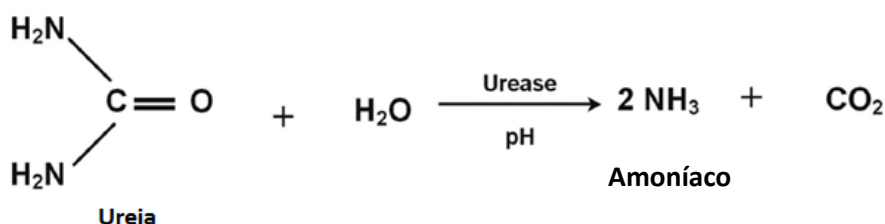


Figura 22- Hidrólise da ureia (Adaptado de Almeida *et al.*,2008).

Numa cuvette colocaram-se 600 μL de reagente 1, o qual se incubou 3 minutos (180 segundos) a 37°C, após o qual se adicionou 6 μL de amostra/controlos/padrão e deixou-se incubar durante 3 minutos (180 segundos). Iniciou-se a reação com 60 μL de reagente 2 e a absorvância foi lida durante 3 minutos a 340 nm.

Para a quantificação de ureia na urina, efetuaram-se diluições de 1:50.

5. Resultados e discussão

5.1 Caracterização química dos óleos essenciais

Os valores do rendimento de extração expressos em planta fresca, a massa volúmica e o índice de refração dos óleos essenciais (OEs) das plantas em estudo estão apresentados no Quadro 2.

Quadro 2 – Valores do rendimento de extração, massa volúmica e índices de refração dos óleos essenciais de *C.nepeta* e de *F.vulgare*.


















Óleo essencial	Rendimento (%)	Massa volúmica (mg/L)	Índice de refração (n_d^{20})
<i>C. nepeta</i>	0,61 ± 0,18	0,989 ± 0,004	1,46 ± 0,001
<i>F. vulgare</i>	0,52 ± 0,22	0,894 ± 0,001	1,51 ± 0,001

Os rendimentos de extração por hidrodestilação foram inferiores a 1%, sendo este considerado um bom rendimento de extração, visto que os rendimentos de extração dos óleos essenciais normalmente nunca são superiores a 1%. O rendimento de extração do óleo essencial de *C. nepeta* foi superior ao rendimento obtido para *F. vulgare*. Apesar de ter um baixo rendimento de extração, a hidrodestilação permite obter OEs muito concentrados e isentos de água. O óleo essencial de *C.nepeta* apresentou densidade de 0,99 e um índice de refração de 1,46, enquanto que o óleo essencial de *F.vulgare* apresentou uma densidade de 0,89 e índice de refração de 1,51.








A caracterização química dos óleos essenciais foi efetuada por cromatografia gás-líquido, com detetor de ionização de chama, GC-FID. O perfil cromatográfico obtido para os OEs de *C. nepeta* e *F. vulgare* estão apresentados no anexo I, Figura 33 e Figura 34, respetivamente. A identificação dos componentes dos OEs foi efetuada por comparação dos TR das amostras com os TR obtidos para os padrões analisados nas mesmas condições cromatográficas e comparação dos IR obtidos com os descritos na bibliografia para o mesmo tipo de colunas.

No Quadro 3, apresenta-se a composição química dos óleos essenciais de *C. nepeta* e *F. vulgare*.

Quadro 3 – Caracterização química dos óleos essenciais de *C. nepeta* e *F. vulgare* por GC-FID (coluna SupelcovaxTM10).

Componentes	Grupo	Tempo de Retenção (min)	Índice de retenção (IR)	% (média ± DP) a	
				<i>C.nepeta</i>	<i>F. vulgare</i>
α - Pineno 	MH	3,558	973	0,85 ± 0,01	2,50 ± 0,01
Canfeno 	MH	3,954	1043	-	0,40 ± 0,01
β- Tujeno	MH	-	-	0,07 ± 0,01	-
β - Pineno 	MH	4,617	1157	1,90 ± 0,01	0,83 ± 0,01
trans-Sabineno	MH	-	-	1,15 ± 0,01	-
β-Mirceno 	MH	5,454	-	0,99 ± 0,01	6,61 ± 4,52
α-Felandreno 	MH	5,568	-	-	6,41 ± 0,06
α-Terpineno 	MH	8,029	1212	-	4,29 ± 0,01
(R)-(+)-Limoneno 	MH	6,488	1215	1,87 ± 0,05	1,23 ± 0,02
1,8-Cineol 	MO	6,829	1227	15,90 ± 0,01	2,59 ± 0,11
β-Ocimeno 	MH	-	-	0,21 ± 0,01	-
γ-Terpineno 	MH	7,578	1256	0,12 ± 0,01	-
ρ-Cimeno 	MH	8,125	1278	0,07 ± 0,01	-
α-Terpinoleno 	MO	8,368	1286	0,07 ± 0,01	-
Fenchona 	MO	12,436	1408	-	20,99 ± 0,15
trans-Hidrato de sabineno 	MO	14,779	1470	3,61 ± 0,01	-
Cânfora 	MO	16,909	1525	-	-
Isopulegona 	MO	-	-	20,32 ± 0,01	-
Isopulegol 	MO	18,944	1578	22,44 ± 0,05	-
Acetato de bornilo	MO	19,354	1593	-	-
4-Terpineol 	MO	20,379	1617	2,50 ± 0,05	-
β- Cariofileno 	SH	20,584	-	2,63 ± 0,38	-
Piperitona 	MO	-	-	5,70 ± 0,36	-

Quadro 3- Caracterização química dos óleos essenciais de *C. nepeta* e *F. vulgare* por GC-FID (continuação).

Componentes	Grupo	Tempo de Retenção (min)	Índice de retenção (IR)	% (média ± DP) a		
				<i>C.nepeta</i>	<i>F. vulgare</i>	
Mentol		MO	21,715	1647	5,28 ± 0,01	-
(S)-(-)-Pulegona		MO	22,499	1671	10,1 ± 0,04	-
Estragol		MO	22,773	1679	-	6,4 ± 0,04
Acetato de terpenilo		MO	24,064	1706	-	-
Borneol		MO	24,134	1709	-	-
α-Terpineol		MO	24,73	1734	0,18 ± 0,01	-
Anetol		MO	35,917	1848	-	46,6 ± 0,05
Total identificado (%)						
Grupos de componentes (%)					98	99
Monoterpenos hidrocarbonados (MH)					7,23	22,27
Monoterpenos oxigenados (MO)					86,16	76,54
Sesquiterpenos hidrocarbonados (SH)					2,63	-
Sesquiterpenos oxigenados (SO)					-	-

Os OEs de *C. nepeta* e *F. vulgare* apresentaram uma composição química muito diversificada, rica em monoterpenos oxigenados, tendo-se observado diferenças na sua composição química, não apenas nos compostos presentes, mas também na percentagem dos mesmos.

O óleo essencial de *C. nepeta* apresentou como constituintes maioritários o isopulegol (22,44%), a isopulegona (20,32%), o 1,8-cineol (15,90%), (S)-(-)-pulegona (10,16%), piperitona (5,70%) e mentol (5,28%). O óleo essencial de *C. nepeta* apresentou também na sua composição química β-cariofileno, um sesquiterpeno hidrocarbonados (2,63%).

Os componentes maioritários do óleo essencial de *F. vulgare* foram o anetol (46,56%), fenchona (20,99%), β-mirceno (6,61%), α-felandreno (6,41%) e o estragol (6,40%).

Os OEs de *C. nepeta* e de *F. vulgare* mostraram-se ricos em compostos monoterpénicos oxigenados, com valores de 86% e de 76,5%, respetivamente. O OE de *F. vulgare* apresentou um conteúdo superior em monoterpenos hidrocarbonados (22%) do que o OE de *C. nepeta* (7%).

A percentagem de monoterpenos oxigenados presentes no OE de funcho, apresentou-se ligeiramente inferior a Anwar *et al.*,2009, o qual demonstrou que o OE de funcho apresenta cerca de 88 % de monoterpenos oxigenados.

A composição química do OE de *C. nepeta* obtido a partir de planta espontânea da região Alentejo é bastante característico e diferente dos estudos publicados. De acordo com a bibliografia, os óleos essenciais desta espécie são conhecidos por serem ricos em monoterpenos oxigenados, nomeadamente mentonas (Kitic *et al.*,2005). Galego *et al.*,2006, realizou o estudo com OE de *C. nepeta* do sul de Portugal, no qual os constituintes maioritários foram a isopulegona e o 1,8-cineol, o que está de acordo com o presente estudo. Num outro estudo, Marongiu *et al.*,2010, comparou dois OEs de *C. nepeta* de diferentes origens, um proveniente de Portugal, cujos componentes maioritários foram isomentona (35,8-51,3 %), 1,8-cineol (21,1-21,4 %) e a trans-pulegona (6-7,8%) e outro proveniente de Itália onde os componentes maioritários foram a pulegona (40-64,4 %), o óxido de piperitona (2,5-19 %) e a piperitona (6,4-7,7 %) e relacionaram as diferenças na composição química com a região geográfica e identificaram 3 quimiotipos, um constituído maioritariamente por mentona, pulegona, limoneno e óxido de piperitona, o segundo, como componentes maioritários óxido de piperitona e o terceiro em que é maioritária a presença pulegona ao invés e mentona. Nos estudos realizados por Panizzi *et al.*,1993 e Flamini *et al.*,1999 com OEs de *C. nepeta* proveniente de Itália apresentaram composições químicas semelhantes, com predomínio de pulegona, mentona, limoneno e óxido de piperitona. Negro *et al.*,2013 identificou 4 quimiotipos nas populações de *C. nepeta* do sul de Itália nos quais predominaram óxido de piperitona (49 %) e óxido de piperitonona (14 %), óxido de piperitonona (39 %), piperitona (21,4 %) e mentona (22,5%), e pulegona (52 %) e mentona (18%), respetivamente.

O funcho espontâneo da região Alentejo é o funcho-doce o qual deve apresentar um teor de anetol superior ao funcho amargo e um teor de fenchona e de estragol menor que o do funcho-amargo, sendo essas proporções consoante o OE for extraído de planta verde, da flor ou do fruto (Cunha *et al.*,2007). As percentagens dos componentes maioritários do OE de funcho variam de estudo para estudo, o anetol é o componente maioritário em diversos estudos, bem como a fenchona, o estragol e o limoneno, variando a sua % consoante a localização geográfica (Diaz- Maroto *et al.*,2006). Segundo Khalid *et al.*,2014, o óleo essencial da folha de funcho apresentou como componentes maioritários trans-anetol (50,6%) e estragol (35,3%). Roby *et al.*,2013, realizou estudos com sementes

de funcho no qual o OE apresentou como constituintes maioritários o anetol e fenchona. Outros estudos efetuados com OE extraído de frutos de *F. vulgare* apresentou como componentes maioritários o trans-anetol, estragol limoneno e fenchona (Pasirija *et al.*,2011; Diao *et al.*,2014). O OE extraído de frutos de funcho doce em vários estados de maturação espontâneas da Turquia mostrou que os componentes maioritários foram o trans-anetol, o estragol, o limoneno e a fenchona e que a composição deste depende do estado de maturação da planta (Telci *et al.*,2009).

5.2 Caraterização química dos extratos aquosos

Os resultados da pesquisa fitoquímica nos extratos aquosos (águas de decocção liofilizadas) de *C. nepeta* e *F. vulgare* apresentam-se na Quadro 4. Os extratos aquosos obtidos a partir das águas de decocção apresentaram elevados conteúdos quer em compostos fenólicos e em flavonóides, dentro dos quais catequinas. Os extratos mostraram-se também ricos em oses e polioses. O extrato aquoso de *F. vulgare* apresentou também elevado conteúdo de coumarinas e vestígios de taninos. Nenhum dos extratos aquosos apresentou a presença de alcalóides, antocianidinas, antocianinas, esteroides e triterpenóides, flavanonois, flavonas, nem de saponinas.

Quadro 4- Resultados da pesquisa fitoquímica dos extratos aquosos de *C. nepeta* e de *F. vulgare*.

Grupos de compostos a pesquisar	Extrato aquoso	
	<i>C. nepeta</i>	<i>F.vulgare</i>
Alcalóides	O	O
Antocianidinas	O	O
Antocianinas	O	O
Coumarinas	O	+++
Catequinas	++	++
Esteróides e triterpenos	O	O
Fenóis	+++	+++
Flavanonóis	O	O
Flavonas	O	O
Flavonóides	+++	++
Flavonóis	O	O
Oses e Polioses	+++	+++
Saponinas	O	O
Taninos	O	+

Presença intensa: +++ Presença: ++ Vestígios: + Ausente: O

Na caracterização dos extratos aquosos procedeu-se também à quantificação dos fenóis totais (Figura 23 A) e de flavonóides totais (Figura 23 B). Os valores de fenóis totais por mg de extrato seco foram expressos em equivalentes de ácido pirogálico (μg) por interpolação dos valores na curva de calibração de fenóis totais expressa em ácido pirogálico, utilizado como padrão (Anexo II, Figura 35 A). Os valores de flavonóides totais por mg de extrato, foi expressa em equivalentes de quercetina, após interpolação gráfica na curva padrão de flavonóides obtida utilizando a quercetina como padrão (Anexo II, Figura 35 B).

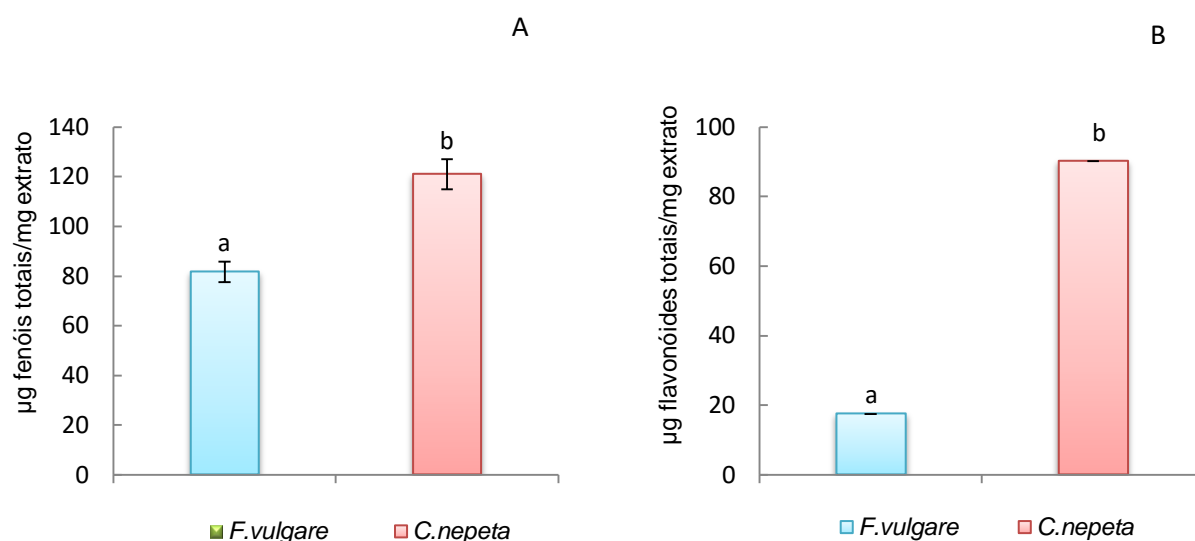


Figura 23 -Quantificação de fenóis totais (A) e flavonóides totais (B).

Cada coluna representa o valor médio de 6 replicados \pm desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas para cada uma das concentrações apresentaram diferenças significativas

Os extratos aquosos apresentaram elevadas concentrações de compostos fenólicos, no entanto o extrato de *C. nepeta* apresentou conteúdo significativamente superior em compostos fenólicos (120 μg /mg extrato) do que o extrato de *F. vulgare* (82 μg /mg). O extrato de *C. nepeta* apresentou também um conteúdo muito superior em flavonóides (90 μg /mg extrato) do que o extrato aquoso de *F. vulgare* (18 μg /mg)

Alguns estudos com extratos aquosos e metanólicos de frutos de funcho demonstraram que estes são ricos em compostos fenólicos, que estão associados na prevenção de doenças provocadas por *stress* oxidativo (Badgujar *et al.*,2014). Outros estudos, referem que os extratos de funcho possuem um maior teor em fenóis totais do que em flavonóides totais (Roby *et al.*,2013; Badgujar *et al.*,2014).

5.3 Avaliação das propriedades antioxidantes

A avaliação das propriedades antioxidantes dos óleos essenciais e dos extratos aquosos de *C. nepeta* e de *F. vulgare* foi efetuada através de três metodologias diferentes, designadamente o método do radical livre DPPH, método do β -caroteno/ácido linoleico e método do poder redutor total, com vista a avaliação do mecanismo de atividade antioxidante preferencial dos compostos presentes nos OEs e extratos em estudo.

5.3.1 Método do radical livre DPPH

Na figura 26, encontram-se apresentados os valores da capacidade de inibição da oxidação observada pelo método do DPPH para os óleos essenciais (Figura 24 A), para os extratos aquosos (Figura 24 B) e para os padrões quercetina e ácido ascórbico (Figura 24 C).

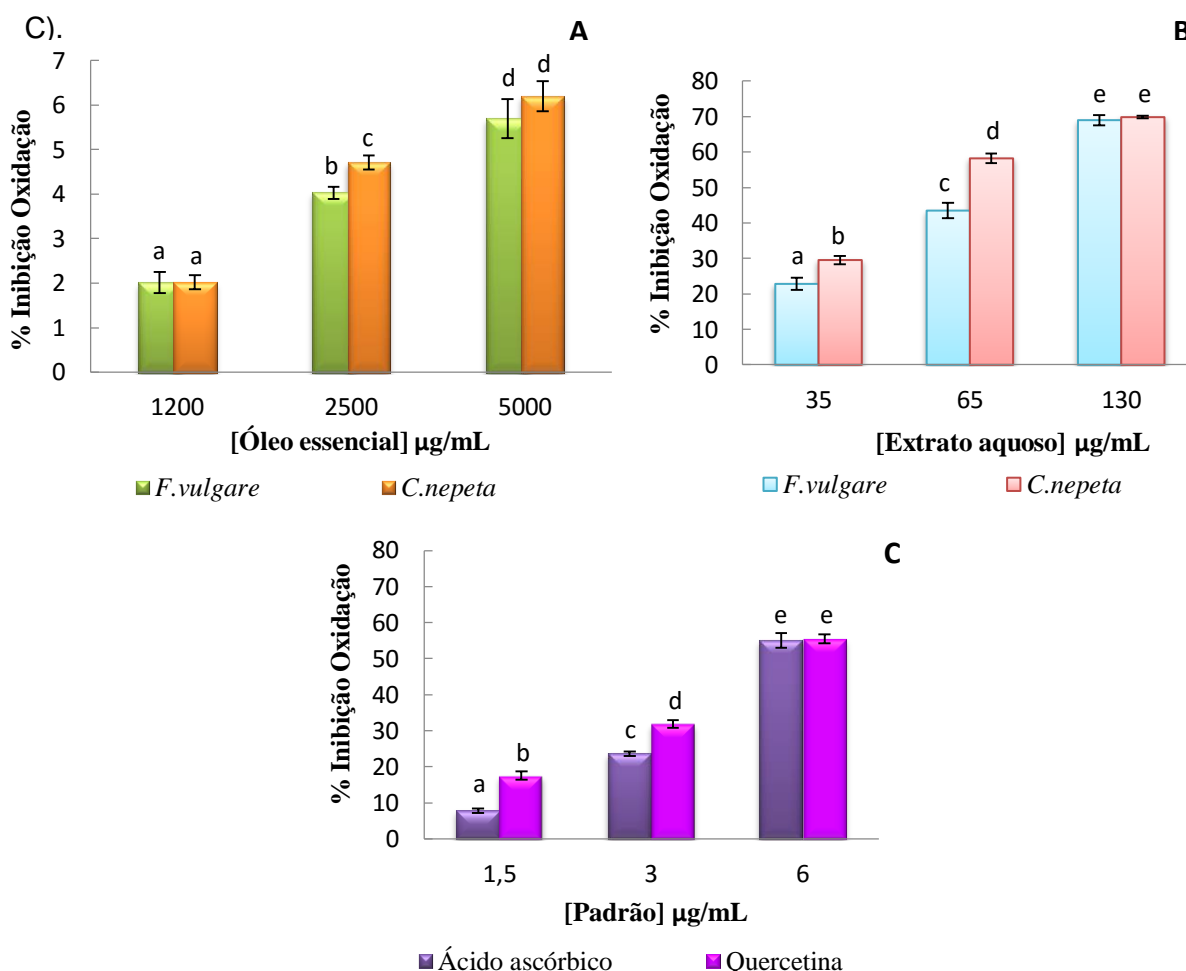


Figura 24- Atividade antioxidante dos óleos essenciais (A), extratos (B) e padrões (C) pelo método do radical DPPH.

Cada coluna representa média de 3 replicados \pm desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas para cada uma das concentrações apresentaram diferenças significativas (Anexo VII, Quadros 16-19)

Os óleos essenciais de *F. vulgare* e *C. nepeta* (Figura 24 A) apresentaram baixa atividade antioxidante pelo método do radical DPPH, indicando que apresentam baixa capacidade para o sequestro de eletrões livres. Observou-se um aumento da atividade antioxidante com o aumento da concentração para os dois OEs em estudo, no entanto, não foi possível obter valores de inibição de oxidação superiores a 10%, mesmo para concentrações de OE muito elevadas (5 mg/mL). No entanto, os extratos aquosos (águas de decocção liofilizadas) (Figura 24 B) apresentaram elevada atividade pelo método do radical DPPH e a mesma ordem de grandeza que a observada para os padrões (Figura 24 C). Observou-se um aumento da inibição de oxidação com o aumento da concentração de extrato, sendo a capacidade para o sequestro de radicais livres do extrato de *C. nepeta* significativamente superior ($p < 0,05$) à observada para o extrato de *F. vulgare*, exceto para a concentração de 130 µg/mL na qual não se observaram diferenças significativas ($p > 0,05$).

Os padrões de atividade antioxidante, quercetina e ácido ascórbico (Figura 24 C) apresentaram atividade antioxidante muito superior à observada para os OEs e também superior à atividade antioxidante dos extratos quando comparados para a mesma concentração testada (Figura 24).

Os valores de IC₅₀ (concentração com capacidade para inibir 50% da oxidação) obtidos para os extratos aquosos e para os padrões com base nas curvas de reação apresentadas no Anexo III, Figura 36 estão apresentados no Quadro 5.

Quadro 5- Valores de IC₅₀ obtidos pelo método do radical livre DPPH para os extratos aquosos e padrões.

	IC ₅₀ (µg/mL)
Extrato aquoso de <i>C. nepeta</i>	55,6
Extrato aquoso de <i>F. vulgare</i>	87,1
Quercetina	5,7
Ácido ascórbico	5,5

Os extratos aquosos de *C. nepeta* e *F. vulgare* apresentaram elevada atividade antioxidante pelo método DPPH, com valores de IC₅₀ de 55,6 e de 87,1 µg/mL, respetivamente. No entanto, estes valores são inferiores aos observados para os padrões ácido ascórbico e quercetina com valores de IC₅₀ de 5,5 e 5,7 µg/mL.

5.3.2 Método do β -caroteno/ácido linoleico

Os valores da atividade antioxidante pelo método do β -caroteno/ ácido linoleico estão apresentados na Figura 25. Os óleos essenciais e os extratos aquosos de *C. nepeta* e *F. vulgare* apresentaram elevada atividade antioxidante pelo método β -caroteno/ ácido linoleico.

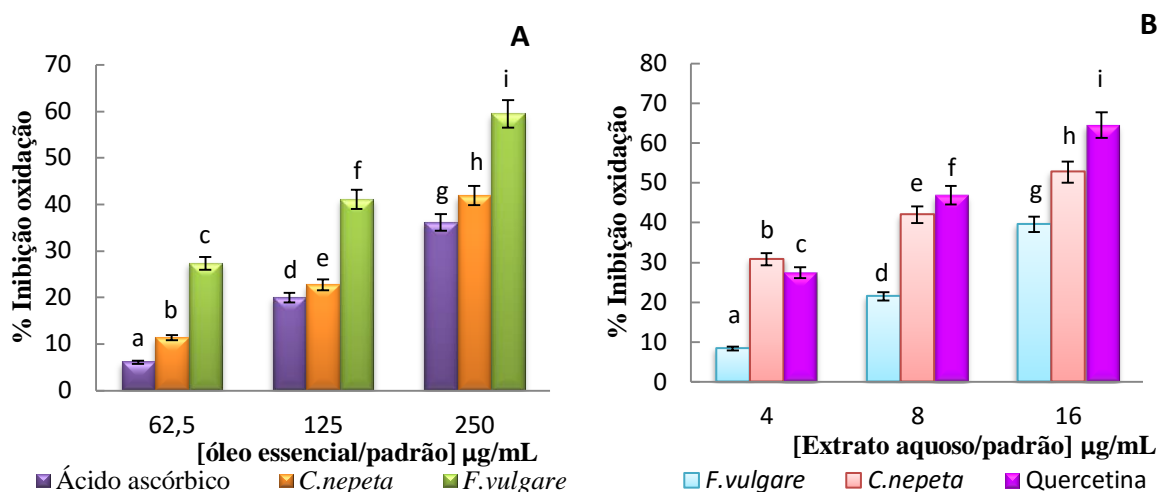


Figura 25- Atividade antioxidante obtida pelo método β -caroteno/ácido linoleico. A- óleos essenciais e ácido ascórbico; B- Extratos aquosos e quercetina. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas apresentam diferenças significativas (Anexo VII, Quadros 20-23)

Observou-se um aumento da atividade antioxidante proporcional ao aumento da concentração. O óleo essencial de *F. vulgare* foi o que apresentou maior atividade antioxidante (Figura 25 A), com valores de inibição da oxidação significativamente superiores aos observados para o óleo essencial de *C. nepeta* e ao padrão ácido ascórbico, para cada uma das três concentrações analisadas ($p < 0,05$).

O extrato aquoso de *C. nepeta* apresentou maior atividade antioxidante significativamente superior à observada para o extrato de *F. vulgare* ($p < 0,05$) (Anexo VII, Quadro 21). Os extratos apresentaram atividade antioxidante, com proteção do substrato lipídico, muito superior à observada para o ácido ascórbico e da mesma ordem de grandeza da observada para a quercetina (Figura 25 B), embora com valores de inibição da oxidação significativamente inferiores nas concentrações de 8 e 16 µg/mL.

No Quadro 6, estão apresentados os valores de IC_{50} para os óleos essenciais e extratos aquosos. Os valores de IC_{50} foram determinados através da interpolação nas curvas de atividade antioxidante obtidas para os OEs, extratos e padrões (Anexo III, Figura 37 A, B, C, D, E e F).

Quadro 6- Valores de IC₅₀ obtidos para os óleos essenciais e extratos aquosos pelo método do β-caroteno/ácido linoleico.

	IC ₅₀ (μg/mL)
OE <i>C. nepeta</i>	853,9
OE <i>F. vulgare</i>	160,2
Extrato aquoso <i>C. nepeta</i>	12,9
Extrato aquoso <i>F. vulgare</i>	31,2
Ácido ascórbico	1116,5
Quercetina	9,05

A atividade antioxidante do OE de *F. vulgare* pelo método β-caroteno/ácido linoleico foi bastante superior à do OE de *C. nepeta* com valores de IC₅₀ de 160 e 854 μg/mL respetivamente. No entanto, esta atividade foi muito superior para os extratos aquosos do que para os OEs (Quadro 6). O extrato aquoso de *C. nepeta* apresentou maior atividade antioxidante que o de *F. vulgare* com valores de IC₅₀ de 12,9 e 31,2 μg/mL respetivamente. O ácido ascórbico apresentou um valor de IC₅₀ de 1116,5 μg/mL, apresentando assim menor atividade que os óleos essenciais e extratos aquosos em estudo. A quercetina, também utilizada como padrão, apresentou elevada capacidade de proteção do substrato lipídico (IC₅₀ de 9,05 μg/mL) muito superior à observada para os óleos essenciais e próxima da observada para os extratos aquosos (Quadro 6).

5.3.3 Método do poder redutor

A atividade antioxidante dos OEs e dos extratos foi também avaliada pelo método do poder redutor. Neste método pretendeu-se observar a presença de substâncias com capacidades de atuarem como redutores e, conseqüentemente evitarem a oxidação. Neste método, quanto maior é a absorvância, maior é o poder redutor observado (Ferreira *et al.*, 2007). Na figura 28, estão apresentados os resultados obtidos para os óleos essenciais (Figura 26 A), extratos aquosos (Figura 26 B) e para os padrões (Figura 26 C).

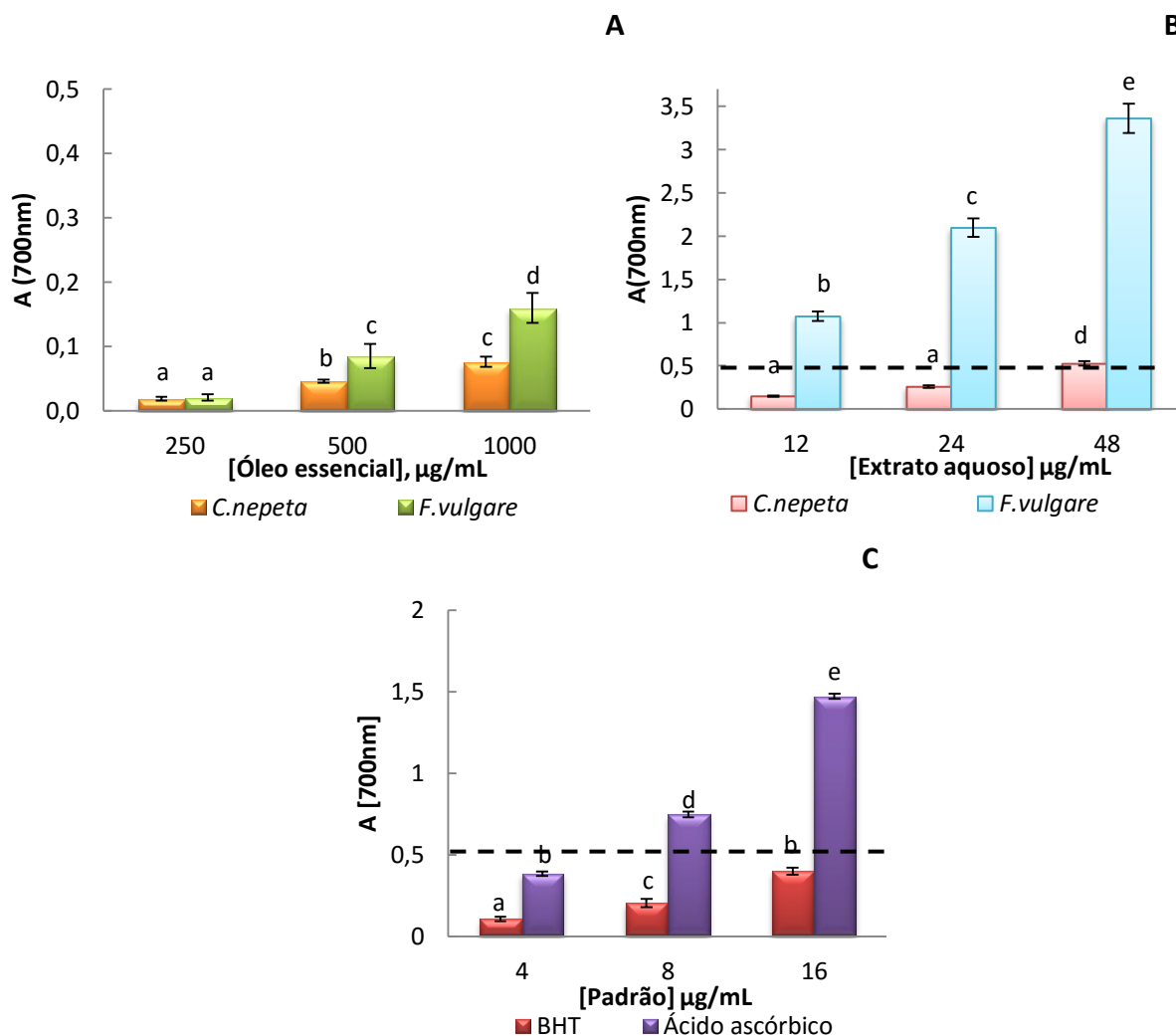


Figura 26- Resultados de atividade antioxidante dos óleos essenciais (A), extratos aquosos (B) e dos padrões (C) pelo método do poder redutor.
A Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas para cada uma das concentrações apresentaram diferenças significativas (Anexo VII, Quadros 24-27)

Os resultados obtidos mostram que os OEs, apresentaram muito baixa atividade antioxidante pelo método do poder redutor, embora o OE de *F. vulgare* tenha apresentado maior poder redutor do que o OE de *C. nepeta*, com diferenças significativas para as concentrações mais elevadas testadas ($p < 0,05$) (Anexo VII, Quadro 24).

No entanto, os extratos aquosos mostraram elevada atividade antioxidante, muito superior à observada para os OEs e também para os padrões (Figura 26 C). O extrato aquoso de *F. vulgare* apresentou capacidade redutora significativamente superior à observada para o extrato de *C. nepeta* ($p < 0,05$).

De acordo com Ferreira *et al.*, 2007, o valor de IC_{50} corresponde à concentração para a qual se obtém um valor de absorvância de 0,5.

No Quadro 7, apresentam-se os valores de IC_{50} dos extratos aquosos e dos padrões. Os valores de IC_{50} foram determinados através da interpolação nas respetivas curvas de calibração (Anexo III, Figura 38). À semelhança dos resultados de atividade antioxidante pelo método DPPH, também não foi possível determinar o valor de IC_{50} dos OEs de *C. nepeta* e de *F. vulgare* devido à baixa capacidade redutora que estes apresentaram (Figura 26 A).

Quadro 7- Valores de IC_{50} obtidos para os extratos aquosos e padrões pelo método do poder redutor.

	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Extrato aquoso <i>C. nepeta</i>	45,7
Extrato aquoso <i>F. vulgare</i>	5,4
BHT	20,1
Ácido ascórbico	5,27

O extrato aquoso de *F. vulgare* apresentou uma capacidade redutora muito superior ao de *C. nepeta*, com um valor de IC_{50} cerca de oito vezes inferior ao obtido para *C. nepeta*. O padrão ácido ascórbico foi o que apresentou maior atividade antioxidante quer em comparação com o BHT (20,1 $\mu\text{g/mL}$), quer em comparação com os extratos aquosos em estudo com um IC_{50} de 5,27 $\mu\text{g/mL}$. A capacidade redutora do extrato de *F. vulgare* foi inferior à observada para o padrão ácido ascórbico, mas bastante superior à do BHT (Quadro 7).

5.3.4 Avaliação da atividade antioxidante dos OEs e dos extratos aquosos pelos diferentes métodos.

Os valores de atividade antioxidante dos OEs e extratos obtidos foram expressos em equivalentes de quercetina ($\mu\text{g/mg}$) e de ácido ascórbico ($\mu\text{g/mg}$) (Quadro 8) através da interpolação nas respetivas curvas de calibração (Anexo III, Figuras 36 e 37).

Comparando a atividade antioxidante dos OEs observada pelos três métodos, podemos dizer que estes apresentaram uma elevada atividade antioxidante preferencial pelo método do β -caroteno/ácido linoleico, muito superior à observada pelo método do radical do DPPH e pelo método do poder redutor.

Quadro 8- Atividade antioxidante dos óleos essenciais e extratos aquosos expressa em equivalentes de quercetina ($\mu\text{g}/\text{mg}$).

Método	Atividade Antioxidante			
	Óleo essencial		Extrato aquoso	
	μg quercetina/mg OE		μg quercetina/mg extrato	
	<i>C.nepeta</i>	<i>F.vulgare</i>	<i>C.nepeta</i>	<i>F.vulgare</i>
Radical DPPH	0,13 \pm 0,04	0,12 \pm 0,09	25,9 \pm 1,32	31,4 \pm 2,86
β-caroteno/ácido linoleico	27,2 \pm 0,04	52,2 \pm 0,09	136,57 \pm 1,5	113,9 \pm 3,0

Quadro 9- Atividade antioxidante dos óleos essenciais e extratos pelos métodos do radical DPPH, β -caroteno/ácido linoleico e poder redutor expressa em equivalentes de ácido ascórbico ($\mu\text{g}/\text{mg}$).

Método	Atividade Antioxidante			
	Óleo essencial		Extrato aquoso	
	μg ácido ascórbico/mg OE		μg ácido ascórbico /mg extrato	
	<i>C.nepeta</i>	<i>F.vulgare</i>	<i>C.nepeta</i>	<i>F.vulgare</i>
Radical DPPH	0,17 \pm 0,06	0,16 \pm 0,12	24,0 \pm 3,9	28,1 \pm 7,0
β-caroteno/ácido linoleico	2,3 \pm 0,06	5,6 \pm 0,12	0,02 \pm 0,8	0,01 \pm 0,1
Poder redutor	2,76 \pm 0,08	6,2 \pm 0,005	64,02 \pm 0,02	401,8 \pm 0,01

Quadro 10- Atividade antioxidante dos óleos essenciais e extratos pelos métodos do poder redutor expressa em equivalentes de BHT ($\mu\text{g}/\text{mg}$).

Método	Atividade Antioxidante			
	Óleo essencial		Extrato aquoso	
	μg BHT /mg OE		μg BHT /mg extrato	
	<i>C.nepeta</i>	<i>F.vulgare</i>	<i>C.nepeta</i>	<i>F.vulgare</i>
Poder redutor	0,61	1,54	38,07 \pm 0,05	5,8 \pm 0,01

Assim, nos óleos essenciais de *C. nepeta* e de *F. vulgare* o mecanismo de ação antioxidante predominante observado foi a proteção do substrato lipídico. Os OEs no presente estudo, apresentaram na sua constituição maioritariamente monoterpenos oxigenados o que pode estar relacionado com a elevada atividade antioxidante apresentada pelos OEs neste método. Estes resultados estão de acordo com um estudo

descrito por Khalid *et al.*, 2014, no qual o OE de folhas de funcho do sul de Marrocos apresentou elevada atividade antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoleico, com valor de IC₅₀ de 82,4 μ g/mL. A elevada atividade antioxidante nos OEs de funcho e calaminta pode estar relacionada com o elevado conteúdo em monoterpenos oxigenados. Estudos de atividade antioxidante mostraram que a elevada atividade antioxidante estava relacionada com a presença e elevado conteúdo de compostos terpénicos oxigenados como o anetol, estragol e fenchona (Faudale *et al.*, 2008; Mohamad *et al.*, 2011; Khalid *et al.*, 2014). Outros estudos referem que OEs ricos em monoterpenos, como o limoneno, 1,8-cineol e o α -terpineno também apresentam elevada atividade antioxidante por este método (Martins *et al.*, 2012). A presença de monoterpenos hidrocarbonados, como o limoneno e o γ -terpineno e a presença de monoterpenos oxigenados como o linalool e o 4-terpineol poderão estar relacionados com as elevadas atividades apresentadas neste método (Ruberto & Baratta, 2000; Shahat *et al.*, 2011).

Por outro lado, os OEs apresentaram baixa atividade pelo método radical DPPH e pelo método do poder redutor, o que poderá estar relacionado com o tipo de compostos presentes na composição química dos óleos essenciais. Alguns estudos efetuados por Galego *et al.*, 2006 e Miguel *et al.*, 2006, referem que o OE de *C.nepeta* apresentou baixa atividade antioxidante pelo método DPPH e poder redutor, o que parece estar relacionado com a sua fraca capacidade para doar eletrões e, Mata *et al.*, 2007, relaciona a presença de baixas atividades antioxidantes pelo método DPPH, devido ao facto dos compostos terpénicos predominantes nestes OEs não possuírem a capacidade de doarem átomos de hidrogénio, referindo que a baixa atividade também pode estar relacionada com a baixa solubilidade dos OEs.

Contrariamente ao observado para os OEs, os extratos aquosos apresentaram elevada atividade antioxidante pelos diferentes métodos de atividade antioxidante estudados, apresentando capacidade como sequestradores de radicais livres, protetores do substrato lipídico e propriedades redutoras importantes no combate da oxidação, podendo ser muito úteis na prevenção de doenças neurodegenerativas e cancerígenas, frequentemente associadas ao *stress* oxidativo (Badgujar *et al.*, 2014).

Esta elevada atividade demonstrada pelos extratos aquosos nos três métodos de atividade antioxidante estudados pode estar relacionado com a presença rica de compostos fenólicos na composição química destes que estão correlacionados com elevadas atividades antioxidantes (Anwar *et al.*, 2009).

Alguns estudos referem que os extratos de funcho mostraram elevada atividade antioxidante, superior à observada para o ácido ascórbico, devido ao seu conteúdo em compostos fenólicos (Satyanarayana *et al.*, 2004; Ebeed *et al.*, 2011). No presente trabalho, o extrato de funcho apresentou atividade antioxidante superior à do ácido ascórbico no

método do β -caroteno/ácido linoleico. Oktay *et al.*,2003, realizou ensaios de atividade antioxidante com extratos aquosos e etanólicos de sementes de funcho que apresentaram elevadas atividades antioxidantes. Por outro lado, extratos aquosos provenientes dos frutos de funcho são descritos na literatura como ricos em compostos fenólicos, o que lhes confere propriedades antioxidantes e hepatoprotetoras (Badgujar *et al.*,2014). O extrato aquoso que apresentou maior atividade foi o de *F.vulgare*, o que pode estar correlacionado com a sua composição rica em fenóis, visto que no ensaio de fenóis totais este apresentou na sua constituição cerca de 80 % de fenóis totais. Anwar *et al.*,2009 realizou estudos de atividade antioxidante com sementes de funcho, estes apresentaram elevada atividade antioxidante pelo método radical DPPH com valores de IC₅₀ de 23,6 μ g/mL. Estudos realizados com extratos metanólicos de *F.vulgare* apresentaram um maior teor em compostos fenólicos totais que em flavonóides totais (Roby *et al.*,2013). Outros estudos referem que os extratos de funcho apresentaram elevadas atividades antioxidantes, superior à observada pelo BHT, enquanto que os OEs apresentaram atividade antioxidante inferior ao observado pelo BHT. No método do poder redutor, os extratos aquosos apresentaram atividades antioxidantes elevadas, superiores ao BHT. Oktay *et al.*,2003 realizou estudos de atividade antioxidante com extratos de *F.vulgare*, os quais apresentaram menor poder redutor que o ácido ascórbico, o que está de acordo com os resultados obtidos, uma vez que se observou uma maior atividade do ácido ascórbico face aos extratos aquosos em estudo.

5.4 Avaliação das propriedades toxicológicas

5.4.1 Letalidade em *Artemia salina*

Os ensaios com *Artemia salina* têm sido vastamente utilizados em diversos estudos de avaliação preliminar de toxicidade, designadamente em estudos com extratos de plantas aromáticas e medicinais, de modo a poder inferir sobre a sua toxicidade *in vivo*, bem como para *screening* de compostos biologicamente ativos (Déciga-Campos *et al.*,2007; Bastos *et al.*,2009).

A análise das curvas dose-resposta obtidas (Figura 27) nos ensaios de letalidade em *A. salina*, com OEs e extratos aquosos permitiu determinar os valores de CL₅₀-concentração letal para 50% da população obtidos na presença dos OEs e extratos aquosos de *C.nepeta* e *F.vulgare*, bem como do dicromato de potássio, usado como controlo positivo.

Os óleos essenciais de *F. vulgare* e *C. nepeta* apresentaram elevada letalidade face a *Artemia salina* com valores de CL_{50} de 200,4 e 266,15 $\mu\text{g/mL}$ respetivamente. Os extratos aquosos muito baixa toxicidade para a *A.salina*, apresentando valores de CL_{50} de 3921 e 4756 $\mu\text{g/mL}$ para o *F.vulgare* e *C.nepeta* respetivamente. O dicromato de potássio, utilizado como controlo positivo, apresentou uma CL_{50} de 45,25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 29 C), sendo assim este mais tóxico que os óleos essenciais e extratos aquosos das duas plantas em estudo.

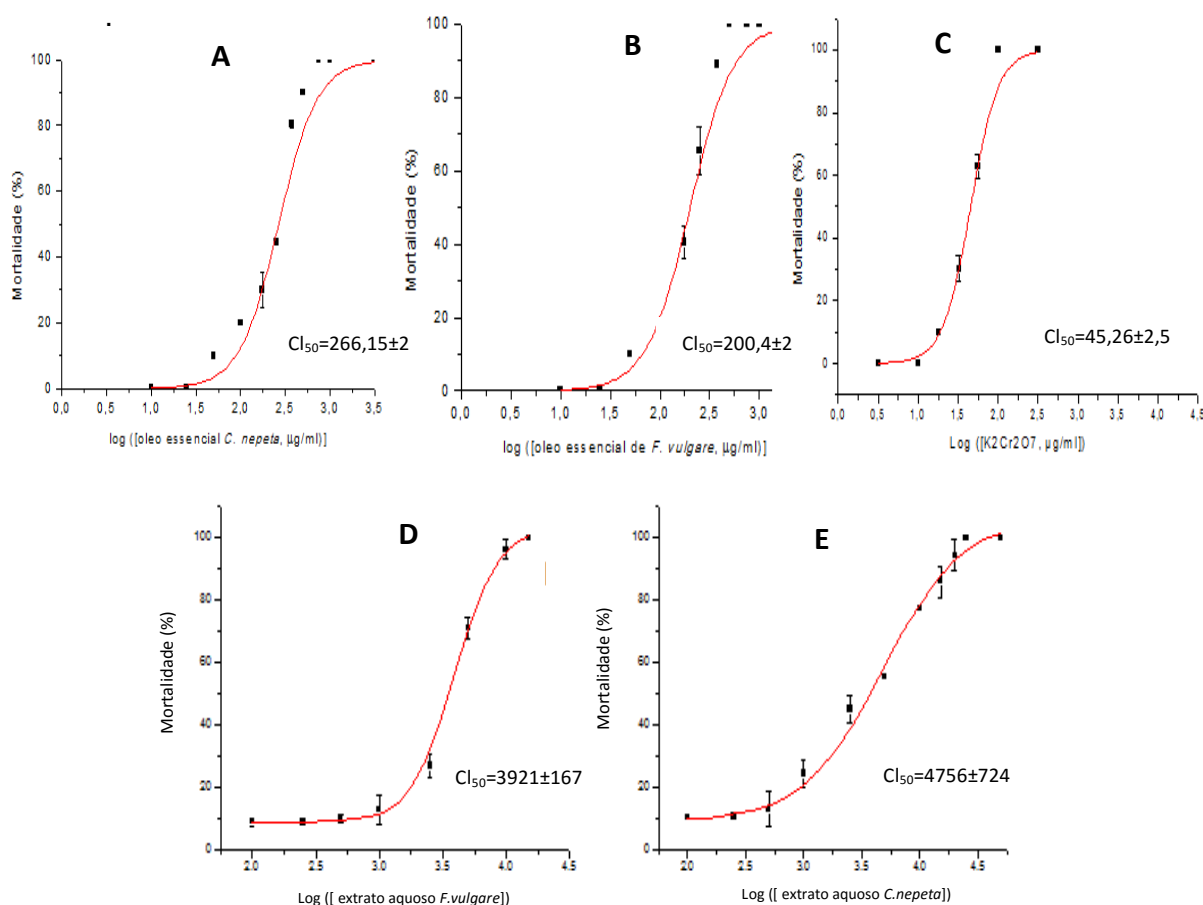


Figura 27- Curvas dose-resposta obtidas nos ensaios de letalidade em *Artemia salina*. A- OE de *C.nepeta*; B- OE de *F.vulgare*; C- Dicromato de potássio; D- Extrato aquoso de *F.vulgare*; E- Extrato aquoso de *C.nepeta*

Bastos *et al.*, 2009, no seu estudo refere que substâncias com $CL_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$, apresentam elevada toxicidade e $CL_{50} >>> 1000 \mu\text{g/mL}$ apresentam muito baixa toxicidade. Assim, os óleos essenciais em estudo apresentaram elevada toxicidade ($CL_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$), visto que apresentaram valores de CL_{50} compreendidos entre 200,4 e 266,2 $\mu\text{g/mL}$, contudo estes foram inferiores à CL_{50} apresentada pelo padrão (45,25 $\mu\text{g/mL}$). Os extratos

aquosos por outro lado, apresentaram muito baixa toxicidade, com valores de $CL_{50} >>> 1000 \mu\text{g/mL}$.

Os estudos de letalidade face a *Artemia salina* com óleos essenciais e extratos de plantas têm sido correlacionados com a sua atividade antioxidante e o seu potencial anti-mutagénico, evidenciando que extratos atividades antioxidantes elevadas e com baixa toxicidade face a *A.salina* estão correlacionadas com o potencial antimutagénico que estes podem apresentar (Déciga-Campos *et al.*,2007).

5.4.2 Avaliação da toxicidade *in vivo*

Os OEs e extratos de *C. nepeta* e *F. vulgare* apresentaram muito baixa toxicidade em ensaios realizados com ratinhos *Swiss*. Os valores de DL_{50} determinados de acordo com as normas OECD (2001) estão apresentados no Anexo IV, Quadro 10. O *screening* farmacológico efetuado durante o estudo de toxicidade aguda OECD (2001) revelou que os animais não apresentaram sinais clínicos de toxicidade. No entanto, observou-se um comportamento passivo nos animais administrados com as doses mais elevadas de OE e de extrato de *C.nepeta*, durante as primeiras 6h de ensaio. Os restantes grupos exibiram um comportamento normal durante os 14 dias de ensaio.

Alguns estudos com óleos essenciais e extratos de funcho demonstram que estes não têm apresentado sinais clínicos de toxicidade, nem têm provocado danos a nível hepático (Taylor *et al.*,1964; Ostad *et al.*,2001; Naga *et al.*,2012;Badgujar *et al.*,2014).

Os resultados obtidos estão de acordo com os estudos descritos por Mesfin *et al.*,2014, realizou estudos de toxicidade aguda, no qual os animais administrados via oral com óleo essencial de funcho apresentaram valores de DL_{50} superior a 2000 mg/kg.

Não se observaram variações significativas no peso dos animais administrados com OE ou extrato comparativamente aos animais controlo. Ao fim de 14 dias de ensaio observou-se um aumento no peso animal (g) em relação ao dia zero do ensaio, sendo este maior nos animais administrados com OE de *C. nepeta* (Anexo IV, Quadros 11 e 12).

. Os óleos essenciais tem sido utilizados em aromaterapia devido aos seus efeitos relaxantes e sedativos (Dobetsberger e Buchbauer, 2011).

Os estudos de toxicidade foram posteriormente efetuados em rato *Wistar*, com vista a avaliar as funções hepática e renal. As atividades dos enzimas hepáticos ALT,AST e ALP foram determinados nos soros dos animais em estudo, recolhido no 14º dia após administração dos OEs de *C. nepeta* e *F. vulgare*. Os resultados foram obtidos através de interpolação nas respetivas curvas de calibração (Anexo V, Figura 39 A, B e C).

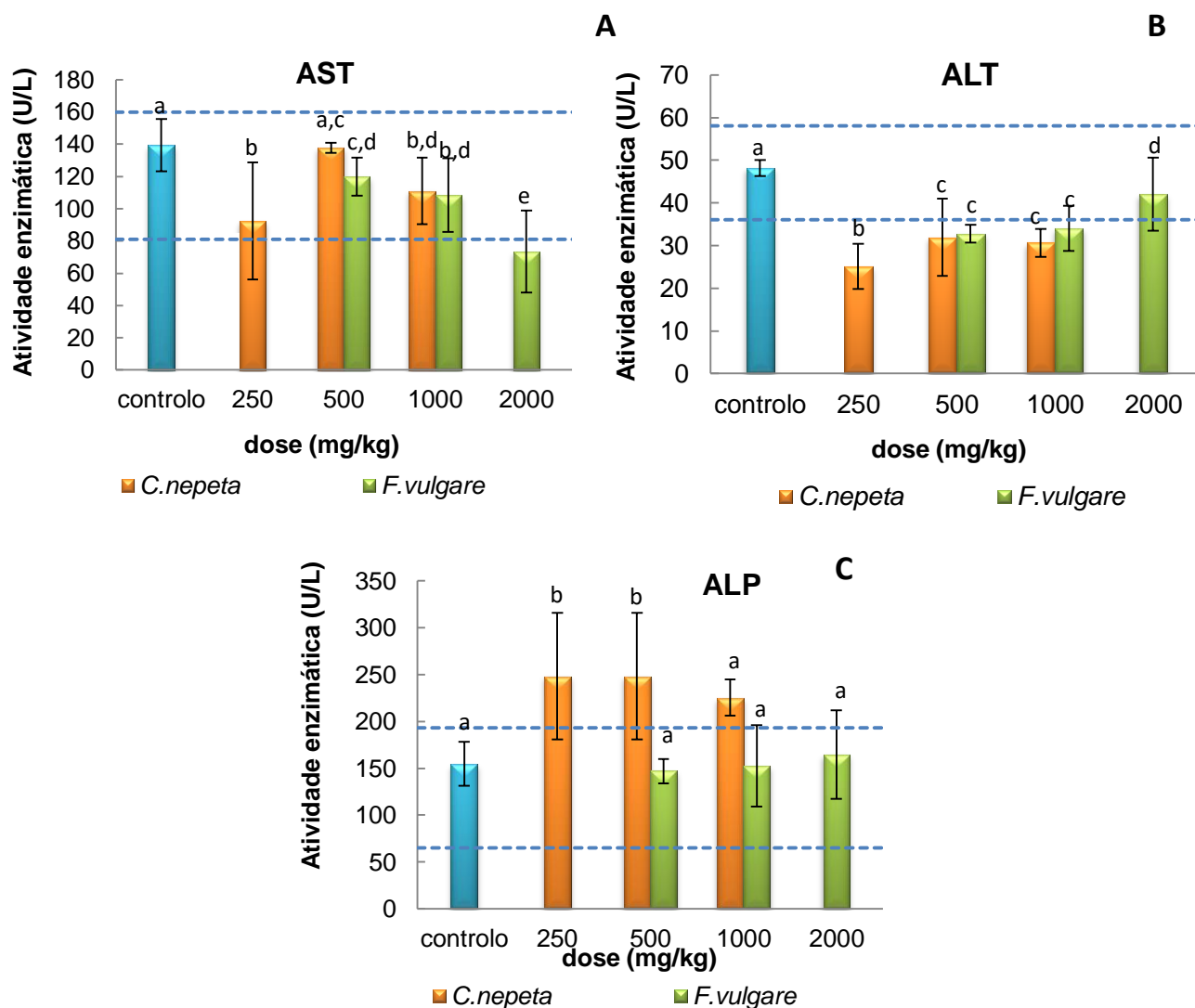


Figura 28- Valores de atividade enzimática biomarcadores de função hepática para nos soros dos animais administrados via oral com óleos essenciais de *C. nepeta* e *F. vulgare*.

A-AST- Aspartato aminotransferase ;B- ALT-alanina aminotransferase; C- ALP-Fosfatase alcalina. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas para cada uma das concentrações apresentaram diferenças significativas (Anexo VI. Quadros 26-28)

Nos animais administrados com óleo essencial de calaminta, observaram-se valores de atividade AST dentro dos valores de referência (81-180 U/L) (Waynforth & Flecknell,1992), com uma diminuição significativa para a dose de 250mg/kg, cerca de metade da observada no grupo controle ($p < 0,05$) (Anexo VII, Quadro 29). Nos animais administrados com a dose de 500 mg/kg *C. nepeta*, observou-se que os valores de atividade AST foram muito próximos do grupo controle. Não se observaram diferenças significativas para a dose de 500 mg/kg ($p > 0,05$), no entanto para a dose de 1000 mg/kg

observou-se uma diminuição significativa dos valores de atividade AST comparativamente ao grupo controlo e ao grupo administrado com 500 mg/kg de OE. Contrariamente ao observado para o óleo essencial de calaminta, no óleo de funcho, observou-se uma tendência da diminuição significativa dos valores de atividade AST com o aumento da dose administrada, sugerindo um possível efeito hepatoprotetor, no entanto, esse efeito teria que ser avaliado num ensaio em que houvesse danos hepáticos prévios (Ozbek *et al.*,2003).

Estudos de hepatotoxicidade realizados com alguns OEs e extratos de funcho mostraram que estes apresentam propriedades hepatoprotetoras, promovendo a recuperação do hepatócito (Ozbek *et al.*,2003; Rabeh & Aboraya,2014).

Os valores de atividade ALT (Figura 28 B) estão de acordo com os observados para a atividade AST, não revelando alteração dos enzimas hepáticos após administração oral dos OEs de *C.nepeta* e *F.vulgare*. Nos animais administrados com OE de *C.nepeta* (250,500 e 1000 mg/kg) observaram-se valores de atividade ALT significativamente inferiores ao grupo controlo ($p<0,05$) (Anexo VII, Quadro 28) e inferiores também aos valores de referência (36-58 U/L) (Waynforth & Flecknell,1992). Nos soros dos animais administrados com OE de *F.vulgare* (500 e 1000 mg/kg) observou-se também uma diminuição significativa dos valores de atividade enzimática comparativamente ao grupo controlo ($p<0,05$). Nos animais administrados com a dose mais elevada (2000 mg/kg) os valores de atividade ALT mantiveram-se dentro do intervalo de referência e não apresentaram diferenças significativas comparativamente ao grupo controlo ($p>0,05$).

A atividade enzimática da fosfatase alcalina (Figura 28 C) foi determinada de modo a complementar o estudo de toxicidade hepática. Os valores de ALP dos animais administrados com OE de *C.nepeta* foram superiores aos valores de referência, com valores significativamente superiores aos do grupo controlo nas três doses administradas ($p<0,05$) (Anexo VII, Quadro 30). No entanto, os animais administrados com *F.vulgare* apresentaram valores de ALP dentro do intervalo de referência e sem diferenças significativas em relação ao grupo controlo ($p<0,05$).

A presença de valores elevados de atividade enzimática da ALP, poderá estar correlacionado com a idade e crescimento do animal, bem como patologias ao nível do fígado ou tecido ósseo (Burtis *et al.*,2008). No que respeita à toxicidade hepática, os valores de atividade ALP não parecem estar relacionados com potencial toxicidade hepática pois são independentes da dose e os valores de AST e ALT estão normais, despistando a possibilidade de patologias hepáticas.

Com vista a monitorização da função renal dos animais administrados via oral com os óleos essenciais de *C. nepeta* e *F. vulgare*, procedeu-se à quantificação de creatinina e ureia nos soros e na urina, bem como a análise sumária da urina para despiste de

substâncias indicadoras de lesão renal na urina onde se pretendeu observar se existiram diferenças ou a presença de algumas substâncias indicadoras de lesão renal na urina. Os resultados foram obtidos através de interpolação nas respetivas curvas de calibração (Anexo VI, Figura 40 A e B).

Na análise sumária da urina dos animais administrados com OE de *F. vulgare* (Anexos VI, Quadro 13), não se observaram diferenças nos parâmetros em análise (pH, leucócitos, corpos cetónicos, bilirrubina, urobilinogénio, sangue), com exceção da presença de nitritos observada em alguns dias do ensaio nas diferentes doses testadas bem como no grupo controlo. Nas urinas administradas com óleo essencial de *C. nepeta* (Anexos VI, Quadro 14), detetou-se a presença de nitritos e sangue em alguns dias do ensaio nas diferentes doses testadas e grupo controlo. A presença de corpos cetónicos na urina, está relacionado com o metabolismo dos ácidos gordos e a elevada ingestão ou absorção de hidratos de carbono. Quando isto ocorre, o organismo compensa este excesso metabolizando ácidos gordos, levando à formação de corpos cetónicos que posteriormente são excretados na urina. A presença de nitritos está relacionada com a presença de bactérias que são capazes de reduzir o nitrato a nitrito. A presença de sangue e leucócitos pode estar relacionada com a presença de algum tipo de lesão (McPherson & Pincus, 2011).

Na figura 29 A e B, estão apresentados os resultados obtidos para a quantificação de creatinina e ureia nos soros dos animais após a administração oral dos óleos essenciais de *C. nepeta* e *F. vulgare*. Os resultados foram obtidos através de interpolação gráfica nas respetivas curvas de calibração (Anexo VI, Figura 40).

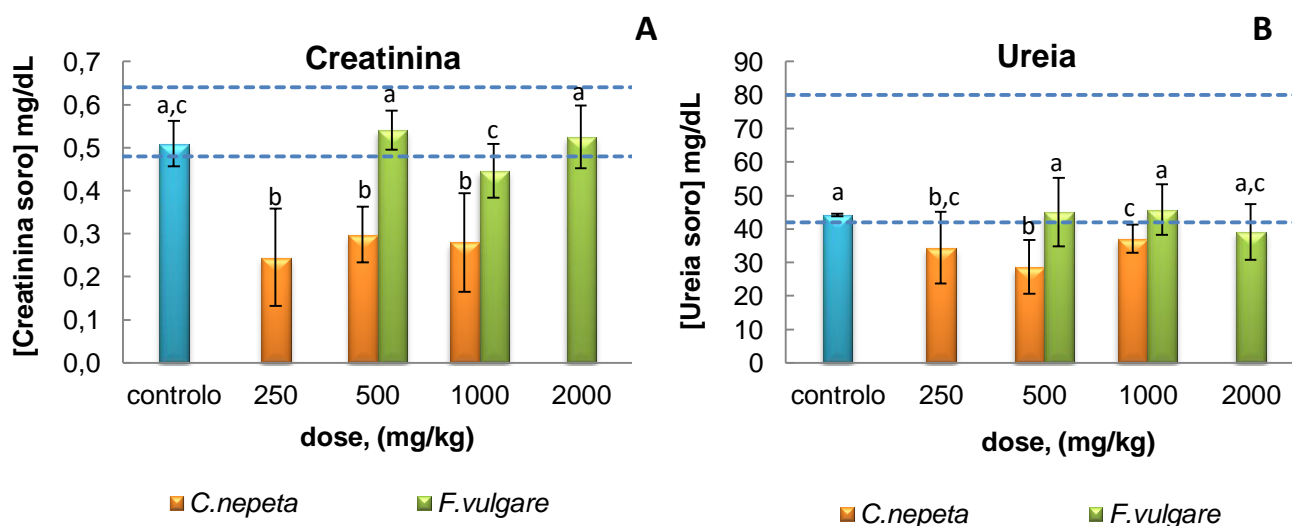


Figura 29 - Quantificação da creatinina (A) e ureia (B) nos soros dos animais após administração oral com os óleos essenciais de *C. nepeta* e *F. vulgare*. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas para cada uma das concentrações apresentaram diferenças significativas (Anexo VII, Quadros 29 e 30).

Ao observarmos os resultados obtidos para a quantificação de creatinina no soro (Figura 29 A), o grupo controlo apresentou uma concentração de creatinina no soro significativamente superior ($p<0,05$) as três doses testadas nos animais administrados com óleo essencial de calaminta, contudo, entre as três doses dos animais administrados com óleo essencial de calaminta, não se observaram diferenças significativas ($p>0,05$). O grupo controlo, apresentou uma concentração de creatinina no soro de 0,5 mg/dL, dentro dos valores de referência, bem como as três doses testadas nos animais administrados com óleo essencial de funcho (Waynforth & Flecknell, 1992). Os animais administrados com óleo essencial de funcho não apresentaram diferenças significativas comparativamente com o grupo controlo nem nas diversas doses entre si, no entanto, apresentaram concentrações de creatinina no soro significativamente superiores ($p<0,05$) às observadas nos animais administrados com óleo essencial de calaminta ($p<0,05$).

O contrário se observou nos animais administrados com óleo essencial de calaminta, as três doses testadas apresentaram valores de creatinina no soro abaixo dos valores de referência. A concentração de creatinina depende de vários fatores externos, tais como a ingestão de proteínas e massa muscular, o que afeta a quantificação desta mesma (McPherson & Pincus, 2011).

Na figura 29 B, estão apresentados os resultados de quantificação de ureia no soro após administração oral do óleo de *C. nepeta* e *F. vulgare*. Os valores de ureia sérica dos animais administrados com óleo essencial de funcho não apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$) comparativamente com o grupo controlo e com os animais administrados nas doses de 500 e 1000 mg/kg. Nos animais administrados com óleo essencial de calaminta, os valores de ureia sérica foram significativamente inferiores ($p<0,05$) aos observados para o grupo controlo e para o grupo administrado com OE na dose de 1000 mg/kg.

A concentração de ureia presente no soro depende do tipo de dieta proteica presente e o tipo de indivíduo, o que afeta a concentração de ureia no soro (McPherson & Pincus, 2011).

A creatinina e ureia também foram quantificadas nas urinas, de modo monitorizar a função glomerular, com determinação da clearance da creatinina. Os resultados obtidos para os animais administrados com óleo de *C. nepeta* estão apresentados na figura 30 A para a creatinina e 30 B para a ureia.

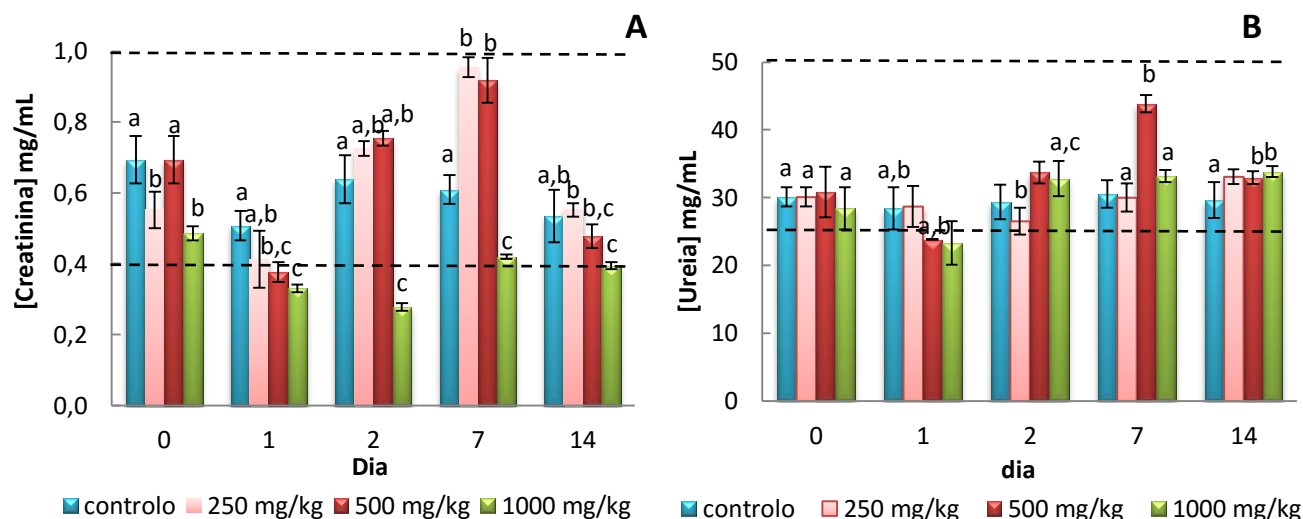


Figura 30- [Creatinina] e [ureia] mg/mL na urina dos animais administrados com óleo essencial de *C.nepeta*. A – Creatinina B- Ureia. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas para cada dia de ensaio apresentaram diferenças significativas (Anexo VII, Quadros 34-39 e Quadros 46-51).

Os resultados obtidos para a quantificação de creatinina nas urinas (Figura 30 A) para os animais administrados com óleo essencial de calaminta não apresentaram qualquer correlação que possa estar correlacionada com a dose administrada, os valores de creatinina mg/mL variam ao longo dos diferentes dias e das diferentes doses administradas. No 14º dia de ensaio observaram-se valores de creatinina na urina (mg/mL) muito semelhantes entre si, com exceção na dose de 1000 mg/kg, na qual se observaram valores de creatinina na urina significativamente inferiores ($p < 0,05$). Os resultados da [ureia] mg/mL mostram que não existiram diferenças significativas entre o grupo controle e as diferentes doses testadas ao longo dos diversos dias apresentados, com exceção no 7º dia em que se observou na dose de 500 mg/kg valores de ureia significativamente superiores ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos para a quantificação de creatinina e ureia mg/mL nas urinas dos animais administrados por via oral com o óleo essencial de funcho estão apresentados na figura 31 A e B.

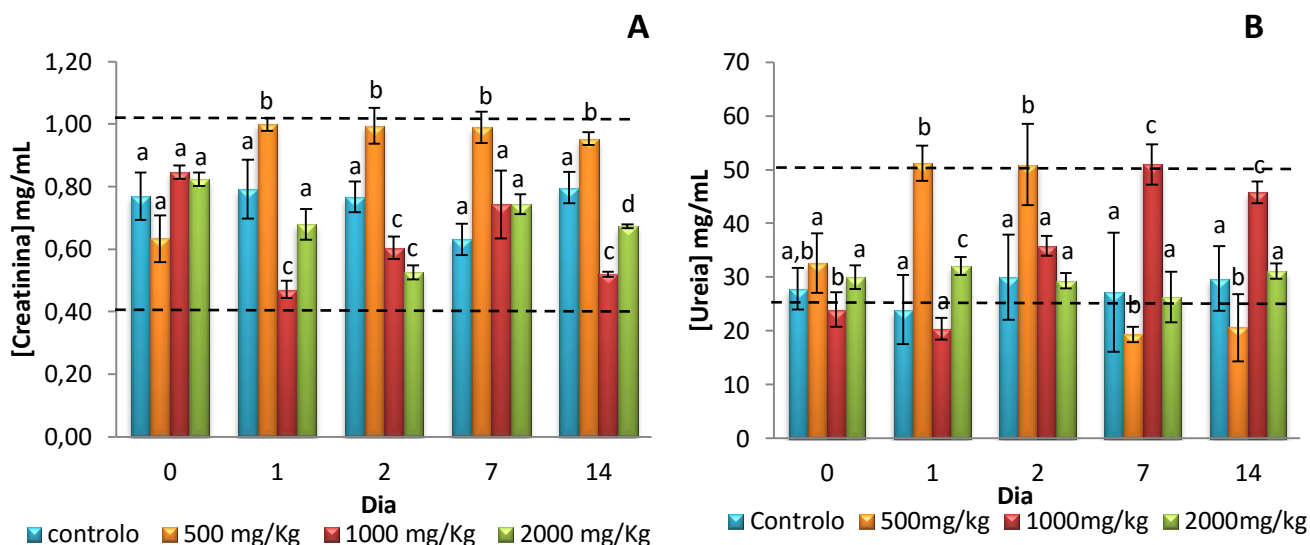


Figura 31- [Creatinina] e [ureia] mg/mL na urina dos animais administrados com óleo essencial de *F.vulgare*. A- Creatinina B- Ureia. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Os grupos assinalados com letras distintas para cada uma das concentrações apresentaram diferenças significativas (Anexo VII, Quadros 40-45 e Quadros 52-57).

Os valores de creatinina mg/mL (Figura 31 A) na urina dos animais administrados com óleo essencial de funcho não apresentaram qualquer correlação com a dose administrada, os valores de creatinina variam ao longo dos diferentes dias e das diferentes doses administradas, com a exceção do dia 0 em que não se observaram diferenças significativas quer para o grupo controlo quer para os animais administrados com OE de funcho. Observou-se também um aumento dos valores de creatinina significativamente superior ($p < 0,05$) ao observado para os controlos, nos dias 1, 2, 7 e 14 na dose de 500 mg/kg, voltando estes valores ao normal nas doses seguintes em comparação com o grupo controlo.

A quantificação de ureia nas urinas dos animais administrados com óleo essencial de funcho (mg/mL) (Figura 31 B) não apresentaram qualquer correlação entre a dose administrada e a [ureia] mg/mL ao longo do ensaio. Observaram-se valores de [ureia] mg/mL significativamente superiores ($p < 0,05$) na dose de 500 mg/kg nos dias 1 e 2 e na dose de 1000 mg/kg nos dias 7 e 14.

A creatinina e ureia são parâmetros que dependem de diversos fatores externos, tais como a massa muscular e o tipo de dieta proteica presente, fatores que permitem explicar a variabilidade observada em alguns dos casos, uma vez que os animais apresentaram diferenças no peso entre si e o tipo de dieta variou consoante a necessidade de cada animal.

A determinação da *clearance* da creatinina (Figura 32) permitiu-nos determinar a taxa de filtração glomerular de modo a permitir verificar se existe alguma disfunção ou alteração da filtração a nível renal.

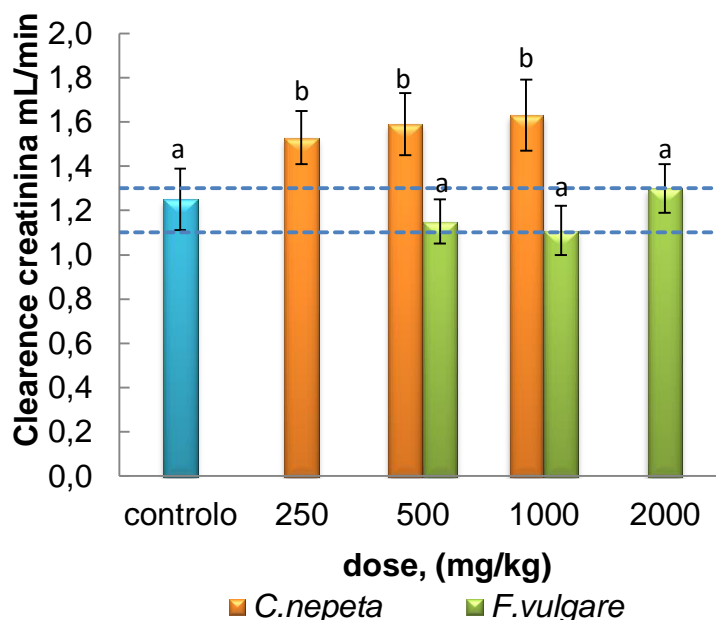


Figura 32- Clearance da creatinina (mL/min) para os animais administrados com óleo essencial de funcho e calaminta. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão.

Os grupos assinalados com letras distintas para cada uma das concentrações apresentaram diferenças significativas (Anexo VI, Quadros 58 e 59)

Nos animais administrados com óleo essencial de funcho não se observaram diferenças significativas nos valores de *clearance* em relação ao grupo controlo, nem para as diferentes doses testadas ($p > 0,05$), no entanto, nos animais administrados com óleo essencial de calaminta, apresentaram valores de *clearance* da creatinina significativamente superiores ($p < 0,05$).

A *clearance* da creatinina é um parâmetro muito importante na avaliação da função renal, em que esta permite-nos determinar a taxa de filtração glomerular, uma vez que por vezes a quantificação de creatinina no soro pode apresentar valores normais, permitindo assim o despiste de disfunções a nível renal. Valores de *clearance* da creatinina baixos e um aumento da concentração de creatinina no soro, seriam indicativos de disfunção renal (McPherson & Pincus, 2011).

Os valores de *clearance* observados situaram-se todos dentro ou acima do intervalo de referência, contrariamente ao que se poderia observar na presença de lesão glomerular.

6. Conclusões e perspectivas futuras

Os óleos essenciais de *C.nepeta* e de *F.vulgare* apresentaram uma composição química rica em monoterpenos oxigenados, no entanto, observou-se uma variabilidade nos seus principais constituintes. Os constituintes maioritários do OE de *C.nepeta* foram: Isopulegol (22,4%), a isopulegona (20,3%) o 1,8-cineol (15,90%), (S)-(-)-pulegona (10,16%), piperitona (5,70%) e mentol (5,28%). enquanto que os constituintes maioritários do OE de *F.vulgare* foram o anetol (46,56%), fenchona (20,99%), β -mirceno (6,61%), α -felandreno (6,41%) e o estragol (6,40%).

A composição química dos OEs e os constituintes presentes em cada OE condicionam as propriedades antioxidantes dos mesmos. Os OEs de *F.vulgare* e *C.nepeta* apresentaram atividade antioxidante predominante pelo método do β -caroteno/ácido linoleico, com valores de IC₅₀ de 160,2 e 853,9 μ g/mL respetivamente. Apesar de apresentarem atividade pelos 3 métodos estudados, os OEs apresentaram muito baixa atividade antioxidante pelos métodos do radical DPPH e poder redutor total, pelo que o seu mecanismo preferencial de ação parece estar mais relacionado com a capacidade para a proteção do substrato lipídico. Esta propriedade parecer estar relacionada com o seu elevado teor em compostos monoterpénicos oxigenados. Além disso, a variabilidade nos constituintes presentes nos OEs de calaminta e funcho parece estar também relacionada com as diferenças na atividade antioxidante dos dois OEs em estudo.

A análise dos hidrolatos por pesquisa fitoquímica revelou a presença de fenóis, flavonóis, flavanonas. Os hidrolatos de *C.nepeta* e de *F.vulgare* apresentaram também elevados conteúdos em fenóis totais expressos em equivalentes de ácido pirogálico (120 e 82 μ g/mg) e em flavonóides totais, expressos em equivalentes de quercetina (90 e 18 μ g/mg). O elevado conteúdo em compostos fenólicos na composição dos extratos justifica as importantes propriedades antioxidantes observadas. Os extratos aquosos apresentaram atividade pelos três mecanismos estudados. Os valores de IC₅₀ dos extratos de *C.nepeta* e de *F.vulgare* no método do radical DPPH, foram de IC₅₀ de 55,6 e 87,1 μ g/mL, pelo método do β - caroteno/ácido linoleico, foram de 12,9 e 31,2 μ g/mL e pelo método do poder redutor, foram de 5,4 e de 45,7 μ g/mL, respetivamente. O extrato de *C.nepeta* apresentou atividade antioxidante superior à observada para o extrato de *F.vulgare* pelos métodos de β -caroteno/ácido linoleico e de DPPH. Estas diferenças poderão estar relacionadas com o seu conteúdo em compostos fenólicos, designadamente em compostos flavonóides, como se observou para o extrato de *C.nepeta*, que apresentou um conteúdo em compostos flavonóides bastante superior ao extrato de *F.vulgare*. Os estudos de letalidade em *A. salina* mostraram que esta apresenta elevada sensibilidade aos OEs de *C.nepeta* e de *F.*

vulgare com valores de CL₅₀ de 266,2 e 200,4 µg/mL respetivamente. No entanto, os extratos aquosos apresentaram baixa toxicidade para *A.salina* com CL₅₀ de 3921 e 4756 µg/mL

Os estudos de toxicidade *in vivo* mostraram que os OEs e os extratos apresentaram baixa toxicidade quando administrados oralmente em ratinhos *Swiss* com valores de DL₅₀ iguais ou superiores a 2000 mg/kg para os OEs e superiores a 5000 mg/Kg para os extratos. Nos estudos de monitorização da função hepática não se observaram variações significativas das atividades de AST, ALT e ALP dos animais administrados com os OEs comparativamente com os controlos, não indicando sinais de toxicidade hepática.

Nos estudos de monitorização da função renal também não se observaram variações significativas nos resultados da análise sumária da urina, nas concentrações de ureia e creatinina séricas e na urina e valores de *clearance* de creatinina, nos animais administrados com os OEs comparativamente com os animais controlo, pelo que os resultados não revelaram sinais de toxicidade renal nem de alteração da função renal, após a ingestão dos OEs nas concentrações testadas.

Assim, pode-se concluir que os OEs e extratos de *C. nepeta* e de *F. vulgare* obtidos a partir de plantas espontâneas da região Alentejo apresentaram promissoras propriedades antioxidantes e baixa toxicidade, resultados que sugerem a potencial aplicação destes produtos de origem natural como nutracêuticos. No entanto, será necessário dar continuidade aos estudos de toxicidade de modo a definir uma dose eficaz e segura.

No sentido de aprofundar o conhecimento sobre as propriedades biológicas dos OEs e extratos em estudo, seria revelante prosseguir os seguintes estudos:

- Avaliar as propriedades antioxidantes dos OEs e extratos com quantificação das atividades enzimáticas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase e redutase, envolvidos geralmente no controlo das reações de oxidação *in vivo*;
- Complementar os estudos de monitorização das funções hepática e biliar, com quantificação de outros biomarcadores, como por exemplo a bilirrubina direta e total e realizar estudos histológicos que complementem os estudos realizados com os biomarcadores séricos, para despiste de toxicidade;

- Avaliar o potencial antimicrobiano dos OEs de *C. nepeta* e de *F. vulgare*, face a bactérias patogénicas e/ou oportunistas e fungos fitopatogénicos e contaminantes de alimentos;
- Avaliar o potencial farmacológico dos OEs e extratos de *C. nepeta* e de *F. vulgare*, com avaliação das suas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, bem como anti-tumorais.

7. Referências bibliográficas

- "Acute Oral Toxicity – Up-and-Down Procedure." OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS 425;
- Adeva-Andany, M., López-Ojén, M., Funcasta-Calderón, R., Ameneiros-Rodríguez, E., Donapetry-García, C., Vila-Altesor, M., and Rodríguez-Seijas, J. (2014) Comprehensive review on lactate metabolism in human health, *Mitochondrion* 17, 76-100;
- Almeida, R. N., Navarro, D. S., and Barbosa-Filho, J. M. (2001) Plants with central analgesic activity, *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 8, 310-322;
- Amorati, R., Foti, M.C., Valgimigli, L. (2013), Antioxidant Activity of Essential Oils, *J. Agric. Food Chem*, 61, 10835–10847;
- Anwar, F., Muhammad, A., Hussaia, A., L., Shahida, M. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. 24, pp.170-176;
- Araniti, F., Lupini, A., Sorgonà, A., Statti, G. A., and Abenavoli, M. R. (2012) Phytotoxic activity of foliar volatiles and essential oils of *Calamintha nepeta* (L.) Savi, *Natural product research*, 1-6;
- Akhila, J. S., Deepa, S., and Alwar, M. C. (2007) Acute toxicity studies and determination of median lethal dose, *Curr. Sci.* 93, 917-920;
- Asiedu-Gyekye, I. J., Antwi, D. A., Awortwe, C., N'guessan, B. B., and Nyarko, A. K. (2014) Short-term administration of an aqueous extract of *kalanchoe integra* var. crenata (Andr.) Cuf leaves produces no major organ damage in Sprague-Dawley rats, *J. Ethnopharmacol.* 151, 891-896.
- Ateba, S. B., Simo, R. V., Mbanya, J. C., Krenn, L., and Njamen, D. (2014) Safety profile and gender specific differences of a methanol extract of *Eriosema laurentii* (Leguminosae) in acute and subchronic (28 days) oral toxicity studies in Wistar rats, *Food Chem. Toxicol.* 65, 27-32;
- A. Proença da Cunha, Ribeiro, J. A., Roque O. R. (2007) Plantas Aromáticas em Portugal: Caracterização e Utilizações. Fundação Calouste Gulbenkian
- Ait- Ouazzou, A., Lorán, S., Arakrak, A., Laglaoui, A., Rota, C., Herrera, A., Pagán, R., Conchello, P. (2012) Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Research International*, 45, 313-319;
- Al-Jaber, N. A., Awaad, A. S., Moses, J. E. (2011). Review on some antioxidant plants growing in Arab world. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15, 293-307;
- Anyasor, G. N., Ogunwenmo, K. O., Oyelana, O. A., Akpofunure, B. E. (2010). Phytochemical constituents and antioxidant activities of aqueous and methanol stem extracts of *Costus afer* Ker Gawl. (Costaceae). *African Journal of Biotechnology*, 9, 4880-4884;
- Bando, N., Hayashi, H., Wakamatsu, S., Inakuma, T., Miyoshi, M., Nagao, A., Yamauchi, R., Terao, J. (2004) Participation of singlet oxygen in ultraviolet-a-induced lipid peroxidation in mouse skin and its inhibition by dietary β -carotene an ex vivo study. *Free Radical Biology & Medicine*, 37, 1854-1863;
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., (2008) Biologycal effects of essential oils- A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475;
- Badgujar, S. B., Patel, V. V., and Bandivdekar, A. H. (2014) *Foeniculum vulgare* Mill: A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Contemporary Application, and Toxicology, *BioMed Research International* 2014, 1-32;

- Baldovini, N., Ristorcelli, D., Tomi, F., and Casanova, J. (2000) Intraspecific variability of the essential oil of *Calamintha nepeta* from Corsica (France), *Flavour and Fragrance Journal* 15, 50-54;
- Baratta, M. T., Dorman, H. J. D., Deans, S. G., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., and Ruberto, G. (1998) Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils, *Flavour and Fragrance Journal* 13, 235-244;
- Barros, L., Carvalho, A. M., and Ferreira, I. C. F. R. (2010) The nutritional composition of fennel (*Foeniculum vulgare*): Shoots, leaves, stems and inflorescences, *LWT - Food Science and Technology* 43, 814-818;
- Bastos, M. L. A., Lima, M. R. F., Conserva, L. M., Andrade, V. S., Rocha, E. M. M., Lemos, R. P. L. (2009). Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tubercuosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8:16;
- Berker, Kadriye Isıl, Kubilay Güçlü, İzzet Tor and Resat Apak. "Comparative Evaluation of Fe(II) Reducing Power-Based Antioxidant Capacity Assays in the Presence of Phenanthroline, Batho-Phenanthroline, Tripyridyltriazine (Frap), and Ferricyanide Reagents." *Talanta* 72, (2007): 1157-1165.
- Benmehdi, H., Hasnaoui, O., Benali, O., and Salhi, F. (2012) Phytochemical investigation of leaves and fruits extracts of *Chamaerops humilis* L., *Journal of Materials and Environmental Science* 3, 320-327;
- Bousetla, A., Konuklugil, B., Bouacida, S., Zellagui, A., Rhouati, S., and Akkal, S. (2013) Phytochemical study of Algerian *Foeniculum vulgare* Mill (Apiaceae), *Der Pharmacia Lettre* 5, 305-307;
- Brewer, M.S. (2011) Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 221-247;
- Burtis C.A., Ashwood E.R, Bruns D.E. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular diagnostics. (2008) 6th edition, Saunders; 1-970;
- Cabral de Oliveira, A., Valentim, I. B., Goulart, O. O. F., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., Trevisan, M. T. S. (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, 32, 689-702;
- Cardile, V., Russo, A., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Arnold, N. A., Piozzi, F. (2009). Essential oils of *Salvia bracteata* and *Salvia rubifolia* from Lebanon: Chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 126, 265-272;
- Carocho, M. & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25;
- Cavaleiro, C., et al. (2004). "Analysis by gas chromatography-mass spectrometry of the volatile components of *Teucrium lusitanicum* and *Teucrium algarbiensis*." *Journal of Chromatography A* 1033: 187-190;
- Celiktaş, O. Y., Kocabaş, E. E. H., Bedir, E., Sukan, F. V., Özek, T., Baş, K. H. C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extract and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100, 553-559;
- Chadwick, L., and Macnab, R. i. p. (2015) Laboratory tests of renal function, *Anaesthesia and intensive care medicine*, 1-5;
- Choi, E., and Hwang, J. (2004) Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*, *Fitoterapia* 75, 557-565;

- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., and Florou-Paneri, P. (2012) Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds, *Agriculture* 2, 228-243.
- Crabtree, D.V., Adler, A. J. (1997) Is β -carotene an antioxidant?. *Medical Hypotheses*, 48, 183-187;
- Dai, J., and Mumper, R. J. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, *Molecules* 15, 7313-7352;
- Demirci, B., Temel, H. E., Portakal, T., Kirmizibekmez, H., Demirci, F., and Baser, K. H. C. (2011) Inhibitory effect of *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* essential oil on lipoxygenase, *Turkish Journal of Biochemistry* 36, 290-295;
- Diao, W., Hu, Q., Zhang, H., and Xu, J. (2014) Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.), *Food Control* 35, 109-116;
- Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Angeles-López, G., Navarrete, A., Mata, R., (2007) Acute toxicity and mutagenic activity fo Mexican plants used in traditional mecidine. *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 334-342;
- Demirci, B., Kosar, M., Demirci, F., Dinç, M., Başer, K. H. C. (2007). Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil of *Chaerophyllum libanoticum* Boiss. Et Kotschy. *Food Chemistry*, 105, 1512-1517;
- Deng, J., Chang, Y., Wen, C., Liao, J., Hou, W., Amagaya, S., Huang, S., Huang, G. (2012). Hepatoprotective effect of the ethanol extract of *Vitis thunbergii* on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats through anti-oxidative activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 142, 795-803;
- Dewick, P.M. (2002) Medicinal Natural products A biosynthetic Approach, 2nd edition
- Descalzo, A. M. & Sancho, A. M. (2008). A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina. *Meat Science*, 79, 423-436;
- Devlin, Thomas M., ed. - Textbook of biochemistry: with clinical correlations. Sixth edition. Hoboken : Wiley-Liss, cop. 2006;
- Dobetsberger, C. and G. Buchbauer (2011). "Actions of essential oils on the central nervous system: An updated review." *Journal Flavour and Fragrance* 26: 300-316.
- Dowd, L. E. (1959) Spectrophometric determination of quercetin. *Analytical Chemistry*, 31, 1184-1187;
- Dutta, R. K., Maharia, R. S., (2012) Antioxidants responses of some common medicinal plants grown in copprr mining areas. *Food Chemistry*, 131, 259-265;
- Ebeed, N. M., Abdou, H. S., Booles, H. F., Salah, S. H., Ahmed, E. S., and Fahmy, K. (2010) Antimutagenic and Chemoprevention Potentialities of Sweet Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) Hot Water Crude Extract, *Journal of American Science* 6, 831-842;
- Ebrahimabadi, A. H., Djafari-Bidgoli, Z., Mazoochi, A., Kashi, F. J., Batooli, H. (2010). Essential oils composition, antioxidant and antimicrobial activity of the leaves and flowers of *Chaerophyllum macropodium* Boiss. *Food Control*, 21, 1173-1178;
- Edris, A. E. (2007) Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review, *Phytother. Res.* 21, 308-323;
- Elizabeth, A. A., Josephine, G., Muthiah, N., and Muniappan, M. (2014) Evaluation of Analgesic and Anti-Inflammatory Effect of *Foeniculum vulgare*, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 5, 658-668;

- Endo, T., Fukunaga, T., Yoshimura, T., Esumi, K. (2006) Scavenging DPPH radicals catalyzed by binary noble metal-dendrimer nanocomposites. *Journal of Colloid and Interface Science*, 302, 516-521;
- Ezeja, M. I., Anaga, A. O., and Asuzu, I. U. (2014) Acute and sub-chronic toxicity profile of methanol leaf extract of *Gouania longipetala* in rats, *J. Ethnopharmacol.* 151, 1155-1164.
- Faudale, M., Viladomat, F., Bastida, J., Poli, F., Codina, C., 2008. Antioxidant activity and phenolic composition of wild, edible, and medicinal fennel from different mediterranean countries. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1912–1920;
- Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., Vilas-Boas, M., Barros, L. (2007) Free radical capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity, *Food Chemistry*, 100, 1511-1516;
- Firuzi, O., Asadollahi, M., Gholami, M., Javidnia, K. (2010) Compositions and biological activities of essential oil from four *Heracleum* species. *Food Chemistry*, 1, 17-122;
- Firenzuoli, F., Jaitak, V., Horvath, G., Bassolé, I. H. N., Setzer, W. N., and Gori, L. (2014) Essential Oils: New Perspectives in Human Health and Wellness, *BMC Complementary & Alternative Medicine* 2014, 1-2;
- Frederice, R., Ferreira, A. P. G., and Gehlen, M. H. (2010) Molecular Fluorescence in Silica Particles Doped with Quercetin-Al³⁺ Complexes, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 21, 1213-1217;
- Gaw A., Murphy, M.J., Srivastava, R., Cowan, R.A., O'Reilly, D.ST.J. (2013) *Clinical Biochemistry* 5th edition, Churchill Livingstone;
- Galego, L., Almeida, V., Gonçalves, V., Costa, M., Monteiro, I., Matos, F., Miguel, G. (2006) Antioxidant activity of the essential oils of *Thymbra capitata*, *Origanum vulgare*, *Thymus mastichina* and *Calamintha baetica*, *Acta Horticulturae*, 27th International Horticultural Congress;
- Ghasemzadeh, A., and Jaafar, H. Z. E. (2011) Effect of CO₂ Enrichment on Synthesis of Some Primary and Secondary Metabolites in Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe), *International journal of molecular sciences* 12, 1101-1114;
- Gowda, S., and Swamy, V. (2012) Histopathological and nephroprotective study of aqueous stem bark extract of *Ficus racemosa* in drug induced nephrotoxic rats, *Journal of Pharmacy* 2, 265-270;
- Giada, M.R. (2013) Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power, 4, 87-112;
- Grassmann, J., Hippeli, S., and Elstner, E. F. (2002) Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress, *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 471-478;
- Grabmann, J. (2005) Terpenoids as Plant Antioxidants, *Vitam. Horm.* 72, 505-535;
- Guyton, A.C., Hall, J.E (2006) *Textbook of Medical Physiology*. 11th edition, Elsevier Saunders, Pennsylvania.
- Hajlaoui, H., Mighri, H., Noumi, E., Snoussi, M., Trabelsi, N., Ksouri, R., Bakhrouf, A. (2010). Chemical composition and biological activities of Tunisian *Cuminum cyminum* L. essential oil: A high effectiveness against *Vibrio* spp. Strains. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2186-2192;
- Haloui, M., Louedec, L., Michel, J., Lyoussi, B. (2000). Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaureum erythraea*. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 465-472;
- Hermann, K. M. (1995) The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds, *The Plant Cell - American Society of Plant Physiologists* 7, 907-919;

- Hirota, B. C. K., Paula, C. S., Miguel, O. G., and Miguel, M. D. (2012) Avaliação de toxicidade *in vitro*: aplicabilidade do ensaio de letalidade frente à *Artemia salina*, *Visão Acadêmica* 13, 42-48;
- Hocayen, P., Campos, L., Pochapski, M., Malfatti, C. (2012) Avaliação da toxicidade do extrato bruto metanólico de *Baccharis dracunculifolia* por meio de bioensaio com *Artemia Salina*, *Revista de Botânica*, 41, 23-31;
- Hodzic, Z., Pasalic, H., Memisevic, A., Srabovic, M., Saletovic, M., and Poljakovic, M. (2009) The Influence of Total Phenols Content on Antioxidant Capacity in the Whole Grain Extracts, *European Journal of Scientific Research* 28, 471-477;
- Huang, X., Choi, Y., Im, H., Yarimaga, O., Yoon, E., and Kim, H. (2006) Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) and Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques, *Sensors* 6, 756-782;
- Infarmed (2005). *Farmacopeia Portuguesa VIII*. Lisboa, Portugal, Infarmed, ed;
- Iriti, M., and Faoro, F. (2009) Chemical Diversity and Defence Metabolism: How Plants Cope with Pathogens and Ozone Pollution, *International journal of molecular sciences* 10, 3371-3399;
- Isman, M. B. (2000) Plant essential oils for pest and disease management, *Crop Protection* 19, 603-608;
- Jayasena, D. D., Ahn, D. U., Nam, K. C., and Jo, C. (2013) Flavour Chemistry of Chicken Meat: A Review, *Journal of Animal Sciences* 26, 732-742;
- Kamatou, G. P. P., Zyl, R. L. V., Vuuren, S. F. V., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Viljoen, A. M. (2008). Seasonal variation in essential oil composition, oil toxicity and the biological activity of solvent extracts of the South African *Salvia* species. *South African Journal of Botany*, 74, 230-237;
- Karawita, R., Siriwardhana, N., Lee, Ki-Wan., Heo, Moon-Soo, Yeo, In-Kyu, Lee, Young-Don, Jeon, You-Jin (2005) Reactive oxygen species scavenging, metal chelation, reducing power and lipid peroxidation inhibition properties of different solvent fractions from *Hizikia fusiformis*. *European Food Research and Technology*, 220, 363-371;
- Kevin T. Patton; Gary A. Thibodeau; *Anatomy & Physiology*, 2012. 8ª edição;
- Khalid, S., Mhamed, R., Mohammed, B., Chakib, A., and Lhoussaine, E. R. (2014) Chemical Composition and Bioactivity of Essential Oils of Seed and Leaf from *Foeniculum vulgare* Mill cultivated in Southeast of Morocco, *Journal of Natural Sciences Research* 4, 33-39;
- Khatiwora, E., Adsul, V. B., Kulkarni, M. M., Deshpande, N. R., Kashalkar, R.V. (2010) Spectroscopic determination of total phenol and flavonoid contents of *Ipomoea carnea*. *International Journal of ChemTech Research*, 2, 1698-1701;
- Lalitha, P., Sripathi, S. K., and Jayanthi, P. (2012) Acute toxicity study of extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 5, 59-61;
- Marcucci, M. C., Ferreres, F., García-Viguera, C., Bankova, V. S., De Castro, S. L., Dantas, A. P., Valente, P. H. M., and Paulino, N. (2001) Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities, *J. Ethnopharmacol.* 74, 105-112;
- Marcucci, M. C.; Woisky, R. G.; Salantino, A. (2001) Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J. Ethnoph.*, v. 74, p. 105-112;
- Markham, K. R. (1982) *Techniques of flavonoid identification*. London: Academic Press;
- Martins, M. R., Tinoco, M. T., Almeida, A. S., Cruz-Morais, J. (2012). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of three essential oils from portuguese flora. *Journal of Pharmacognosy*, 3, 39-44;

- Martins, M. R., Arantes, S., Candeias, F., Tinoco, M. T., and Cruz-Morais, j. (2014) Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils, *J. Ethnopharmacol.* 151, 485-492;
- Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Maxia, A., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., and Salgueiro, L. (2010) Chemical composition and biological assays of essential oils of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta* (Lamiaceae), *Natural product research* 24, 1734-1742.
- Mansour, S. A., Heikal, T. M., Refaie, A. A., and Mossa, A. (2011) Antihepatotoxic activity of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) essential oil against chlorpyrifos-induced liver injury in rats, *Global Journal of Environmental Science and Technology* 1, 1-11.
- Mazid, M., Khan, T., and Mohammad, F. (2011) Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants, *Biology and Medicine* 3, 232-249;
- Mansour, M. A., Ginawi, O. T., El-Hadiyah, T., El-Khatib, A. S., Al-Shabanah, O. A., and Al-Sawaf, H. A. (2001) Effects of volatile oil constituents of *Nigella Sativa* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone, *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 110, 239-251;
- Miguel, M. G. (2010) Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review, *Molecules* 15, 9252-9287;
- Mata, A. T., Proença, C., Ferreira, A. R., Serralheiro, M. L. M., Nogueira, J. M. F., Araújo, M. E. M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, 103, 778-786;
- Mbwambo, Z. H., Moshi, M. J., Masimba, P. J., Kapingu, M. C., Nondo, R. S. O. (2007). Antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of extracts of *Terminalia brownii* roots and stem. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 7:9;
- McPherson, R.A., Pincus, M.R. (2011) Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd edition. Elsevier Saunders;
- Mesfin, M., Asres, K., and Shibeshi, W. (2014) Evaluation of anxiolytic activity of the essential oil of the aerial part of *Foeniculum vulgare* Miller in mice, *BMC Complementary & Alternative Medicine* 14, 1-7;
- Mittal, D. K., Joshi, D., and Shukla, S. (2012) Hepatoprotective role of herbal plants - a review, *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences* 3, 150-157;
- Miguel, G., Simões, M., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Carvalho, L. (2004). Compositon and antioxidante activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chemistry*, 86, 183-188;
- Miguel, G., Caçador, H., Faleiro, L., Galego, L., Almeida V., Costa, M. (2006) Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Origanum* spp. and *Calamintha baetica*, Conference "Traditional Food Processing and Technological Innovation in Peripheral Regions";
- Mohamed, E. A. H., Lim, C. P., Ebrika, O. S., Asmawi, M. Z., Sadikun, A., and Yam, M. F. (2011) Toxicity evaluation of a standardised 50% ethanol extract of *Orthosiphon stamineus*, *J. Ethnopharmacol.* 133, 358-363;
- Mohamad, R.H., El-Bastawesy, A.M., Gamil, M., Noor, A.M.A.M., Al-Mehdar, H.A.R., Sharawy, S.M., El-Merzabani, M. (2011) Antioxidant and Anticarcinogenic Effects of Methanolic Extract and Volatile Oil of Fennel Seeds (*Foeniculum vulgare*) 14(9): 986-1001;
- Móron, U.M., Castilla-Cortázar, I. (2012) Protection Against Oxidative Stress and "IGF-I Deficiency Conditions, *Intech*, 4, 89-116;
- Mottram, R. (2007). "The LRI and odour database." Retrieved, from <http://www.odour.org.uk/>.

- Nassar, M. I., Aboutabl, E.-S., Makled, Y. A., El-Khrisy, E. A., and Osman, A. F. (2010) Secondary metabolites and pharmacology of *Foeniculum vulgare* Mill. Subsp. *Piperitum*, *Revista Latinoamericana de Quimica* 38, 103-112;
- Negro, C., Notarnicola, S., De Bellis, L., Miceli, A. (2013) Intraspecific variability of the Essential oil of *Calamintha nepeta* subsp. *Nepeta* from Southern Italy (Apulia), *Natural Product research*, 27, 331-339;
- Nelson, D.L., Cox, M.M. (2004) Lehninger Principles of Biochemistry. 4th edition; W. H. Freeman & Company;
- Oliveira, D. R., Leitão, G. G., Bizzo, H. R., Lopes, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., Leitão, S. G. (2007). Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of Lippia origanoides H.B.H. *Food Chemistry*, 101, 236-240;
- Okoh, O. O., Sadimenko, A.P., Afolayan, A.J. (2010) Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry*, 120, 308-312;
- Oktay, M., Gulcin, I., and Kufrevioglu, O. I. (2003) Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts, *LWT - Food Science and Technology* 36, 263-271.
- Ozhogina, O. A. & Kasaikina, O. T. (1995). β -Carotene as an interceptor of free radicals. *Free Radical Biology & Medicine*, 19, 575-581;
- Özbek, H., Ugras, S., Dülger, H., Bayram, I., Tuncer, I., Öztürk, G., and Öztürk, A. (2003) Hepatoprotective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil, *Fitoterapia* 74, 317-31;
- S. N. Ostad, M. Soodi, M. Shariffzadeh, N. Khorshidi, and H. Marzban, "The effect of fennel essential oil on uterine contraction as a model for dysmenorrhea, pharmacology and toxicology study," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 76, no. 3, pp. 299–304, 2001;
- Pacifico, S., Galasso, S., Piccolella, S., Kretschmer, N., Pan, S., Marciano, S., Bauer, R., and Monaco, P. (2015) Seasonal variation in phenolic composition and antioxidant and anti-inflammatory activities of *Calamintha nepeta* (L.) Savi, *Food Research International* 69, 121-132;
- Pallab, K., Tapan, B., Tapas, P., and Ramen, K. (2013) Estimation of total flavonoids content (TFC) and antioxidant activities of methanolic whole plant extract of biophytum sensitivum linn, *Journal of Drug Delivery & Therapeutics* 3, 33-37;
- Pimentel, M. F., Silva Junior, F. C. G., Santaella, S. T., and Lotufo, L. V. C. (2011) O Uso de *Artemia* sp. como Organismo-Teste para Avaliação da Toxicidade das Águas Residuárias do Beneficiamento da Castanha de Caju Antes e Após Tratamento em Reator Biológico Experimental, *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* 6, 15-22.
- Pina-Vaz, C., Rodrigues, A. G., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, Tavares, C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Gonçalves, M. J., Martinez-de-Oliveira, J. (2004) *European Academy of Dermatology and Venereology*, 18, 73-78;
- Quintas, Alexandre ; Freire, Ana Ponces ; Halpern, Manuel J. - Bioquímica : organização molecular da vida. Lisboa : Lidel, 2008;
- Rabeh, N. M., and Aboraya, A. O. (2014) Hepatoprotective Effect of Dill (*Anethum graveolens* L.) and Fennel (*Foeniculum vulgare*) Oil on Hepatotoxic Rats, *Pakistan Journal of Nutrition* 13, 303-309;
- Rahimi, R., and Ardekani, M. R. S. (2013) Medicinal Properties of *Foeniculum Vulgare* Mill. in Traditional Iranian Medicine and Modern Phytotherapy, *Chinese Journal Integrative Medicine* 19, 73-79;

- Ramsden, C. E., Ringel, A., Feldstein, A. E., Taha, A. Y., Macintosh, B. A., Hibbeln, J. R., Majchrzak-Hong, S. F., Faurot, K. R., Rapoport, S. I., Cheon, Y., Chung, Y., Berk, M., and Mann, J. D. (2012) Lowering dietary linoleic acid reduces bioactive oxidized linoleic acid metabolites in humans, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 87, 135-141;
- Rather, M. A., Dar, B.A., Sofi, S.N., Bhat, B.A., Qurishi, M.A. (2012) *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry*;
- R. Naga Kishore, N. Anjaneyulu, M. Naga Ganesh, and N. Sravya, "Evaluation of anxiolytic activity of ethanolic extract of *Foeniculum vulgare* in mice model," *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 4, no. 3, pp. 584– 586, 2012.
- Roby, M.H.H., Sarhan, M., Selim, K., Khalel, K. (2013) *Industrial Crops and Products*, 44, 437-445;
- Rodríguez, A., Batlle, R., Nerín, C. (2007). The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II. *Progress in Organic Coating*, 60, 33-38;
- Rodríguez-Solana, R., Salgado, J. M., Domínguez, J. M., and Cortés-Diéguez, S. (2014) Characterization of fennel extracts and quantification of estragole: Optimization and comparison of accelerated solvent extraction and Soxhlet techniques, *Industrial Crops and Products* 52, 528-536;
- Sadrefozalayi, S., and Farokhi, F. (2014) Effect of the aqueous extract of *Foeniculum vulgare* (fennel) on the kidney in experimental PCOS female rats, *Avicenna Journal of Phytomedicine* 4, 110-117;
- Şahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G., Özer, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *Vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15, 549-557;
- Salgueiro, L., Vila, R., Tomás, X., Cañigueral, S., Proença da Cunha, A., Adzet, T. (1997) *Biochemical systematics and Ecology*, 25, 659-672;
- Sarikurcu, C., Bektas, T., Daferera, D., Polissiou, M., Harmadar, M. (2008) Studies of the antioxidant activity of the essential oil and extract of *Marrubium globosum* subsp. *globosum* (Lamiaceae) by three different chemical assays. *Bioresource Technology*, 99, 4239-4246;
- Sarikurcu, C., Arisoy, K., Tepe, B., Cakir, A., Abali, G., Mete, E. (2009). Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2479-2483;
- Satyanarayana, S., Sushruta, K., Sarma, G.S., Srinivas, N., Subba Raju, G.V. (2004). Antioxidant activity of the aqueous extracts of spicy food additives: evaluation and comparison with ascorbic acid in in-vitro systems. *J Herb Pharmacother.* 4(2): 1-10;
- Sharififar, F., Moshafi, M. H., Dehghan-Nudehe, G., Ameri, A., Alishahi, F., Pourhemati, A. (2009). Bioassay screening of the essential oil and various extracts from 4 spices medicinal plants. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 22, 317-322;
- Shahat AA, Ibrahim AY, Hendawy SF, Omer EA, Hammouda FM, Abdel-Rahman FH, Saleh MA (2011) Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. *Molecules* 16:1366– 1377;

- Shaheen, U., Manzoor, Z., Khaliq, T., Kanwai, A., Muhammad, F., Hassan, I. J., Munawar, S. H., and Mazhar-ul-Haq. (2014) Evaluation of Nephroprotective Effects of *Foeniculum vulgare* Mill, *Solanum Nigrum* Linn and their Mixture against Gentamicin-induced Nephrotoxicity in Albino Rabbits, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 25, 1-9;
- Shimizu, Y., Nakazato, M., Sekita, T., Kadota, K., Yamasaki, H., Takamura, N., Aoyagi, K., Kusano, Y., and Maeda, T. (2013) Association between alkaline phosphatase and hypertension in a rural Japanese population: The Nagasaki Islands study, *Journal of Physiological Anthropology* 32, 1-8;
- Silva, M. L. C., Costa, R. S., Santana, A. S., and Koblitiz, M. G. B. (2010) Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais, *Semina: Ciências Agrárias* 31, 669-682;
- Singh, M., Sharma, S., Khokra, S. L., Sahu, R. K., and Jangde, R. (2011) Preparation and evaluation of herbal cosmetic cream, *Pharmacologyonline* 2, 1258-1264;
- Singh, G., Maurya, S., Lampasona, M. P., and Catalan, C. (2006) Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract, *Food Control* 17, 745-752;
- Singh, M., Gupta, S., Singhal, U., Pandey, R., and Aggarwal, S. K. (2013) Evaluation of the oxidative stress in chronic alcoholics, *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 7, 1568-1571;
- Singla, R., Ganguli, A., Ghosh, M. (2011). Na effective combined treatment using malic acid and ozone inhibits *Shigella* spp. on sprouts. *Food Control*, 22,1032-1039;
- Smith, C., Marks, A., Lieberman, M. (2005) Marks' Basic Medical Biochemistry A clinical Approach. 2nd edition, Lippincott Williams & Wilkins;
- Sonibare, O. O. & Effiong, I. (2008). Antibacterial activity and cytotoxicity of essential oil of *Lantana Camara* L. leaves from Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 7, 2618-2620;
- Sousa, C. M. M., Rocha e Silva, H., Vieira-Jr, G. M., Ayres, M. C. C., Da Costa, C. L. S., Araújo, D. S., Cavalcante, L. C. D., Barros, E. D. S., Araújo, P. B. M., Brandão, S., Chaves, M. H. (2007) Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 2, 351-355;
- Stenberg, C., Svensson, M., Johansson, M. (2005) A study of the dryig of linseed oils with different fatty acid patterns using RTIR-spectroscopy and chemiluminescence (CL). *Industrial Crops and Products*, 21, 263-272;
- Tang, S. Y. & Halliwell, B. (2010). Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditi elegans* studies?. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394, 1-5;
- Sucupira, N. R., Silva, A. B., Pereira, G., and Costa, J. N. (2012) Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos, *Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde* 14, 263-269.
- Tanira, M. O. M., Mohsin, A., shah, A., H., Ageel, A. M., and Qureshi, S. (1996) Pharmacological and Toxicological Investigations on *Foeniculum vulgare* Dried Fruit Extract in Experimental Animals, *Phytother. Res.* 10, 33-36;
- Taylor J. M., Jenner P. M; Jones W. I., "A comparison of the toxicity of some allyl, propenyl, and propyl compounds in the32 BioMed Research International rat," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 6, no. 4, pp. 378– 387, 1964;
- Telci, I., Demirtas, I., and Sahin, A. (2009) Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruits during stages of maturity, *Industrial Crops and Products* 30, 126-130;

- Tepe, B., Akpulat, H. A., Sokmen, M., Daferera, D., Yumrutas, O., Aydin, E., Polissiou, M., Sokmen, A. (2006). Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. *Food Chemistry*, 97, 719-724;
- Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D., Vardar-Unlu, G., Polissiou, M., Sokmen, A. (2004). Antimicrobial and antioxidative activities of essential oils and metanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food Chemistry*, 84, 519-525;
- Tepe, B., Eminagaoglu, O., Akpulat, H. A., Aydin, E. (2007). Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *Verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. *Food Chemistry*, 100, 985-989;
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. a., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A. (2005). Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* sbsp. *Sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering*, 66, 447-454;
- Tepe, B., Sokmen, M., Sokmen, A., Daferera, D., Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidative activity of the essential oil and various extracts of *Cyclotrichium organifolium* (Labill.) Manden. & Scheng. *Journal of Food Engineering*, 69, 335-342;
- Tsai, J., Huang, G., Chiu, T., Huang, S., Huang, S., Huang, T., Lai, S., Lee, C. (2011). Antioxidant activities of phenolic components from various plants of *Desmodium* species. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5, 468-476;
- Ünlü, M., Daferera, D., Dönmez, E., Polissiou, M., Tepe, B., Sökmen, A. (2002). Compositions and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae). *Journal of Ethnopharmacology*, 83, 117-121;
- Uzel, A., Guvensen, A., Cetin, E. (2004). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Anthemis xylopoda* O. Schwarz from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 151-154;
- Veerappan, A., Miyazaki, S., Kadarkaraisamy, M., and Ranganathan, D. (2007) Acute and subacute toxicity studies of *Aegle marmelos* Corr., an Indian medicinal plant, *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 14, 209-215;
- Waynforth, H. B., Flecknell, P. A. (1992) Experimental and surgical technique in the rat, Academic press limited, 2nd edition;
- Wu, H., Raza, W., Fan, J., Sun, Y., Bao, W., Liu, D., Huang, Q., Mao, Z., Shen, Q, Miao, W. (2008). Antibiotic effect of exogenously applied salicylic acid on in vitro soilborne pathogen, *Fusarium oxysporum* f.sp.niveum. *Chemosphere*, 74, 45-50;
- Yazaki, K. (2006). ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Letter*, 580, 1183-1191;

Sites consultados:

[1] <http://www.flora-on.pt/>, consultado dia 13/03/2015

[2] "Flora Digital of Portugal", Jardim Botânico, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro http://www.jb.utad.pt/pt/herbario/cons_reg.asp., consultado dia 16/02/2015

8. Anexos

I. Caraterização química dos óleos essenciais

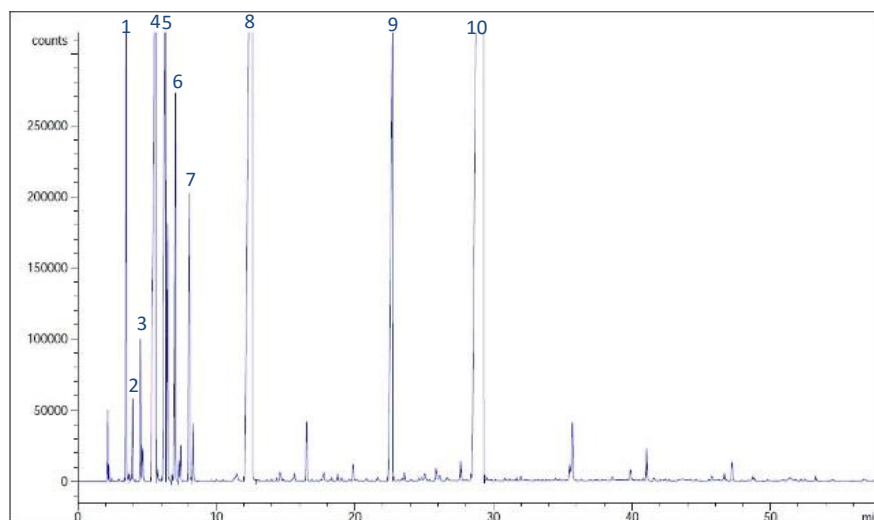


Figura 33- Cromatograma do óleo essencial de *Foeniculum vulgare* por análise GC-FID
1- α -pineno; 2- canfeno 3- β -pineno; 4- β -mirceno; 5-(R)-(-)-Limoneno; 6- 1,8-cineol; 7- α -terpineno; 8- Fenchona; 9- Estragol; 10- Anetol.

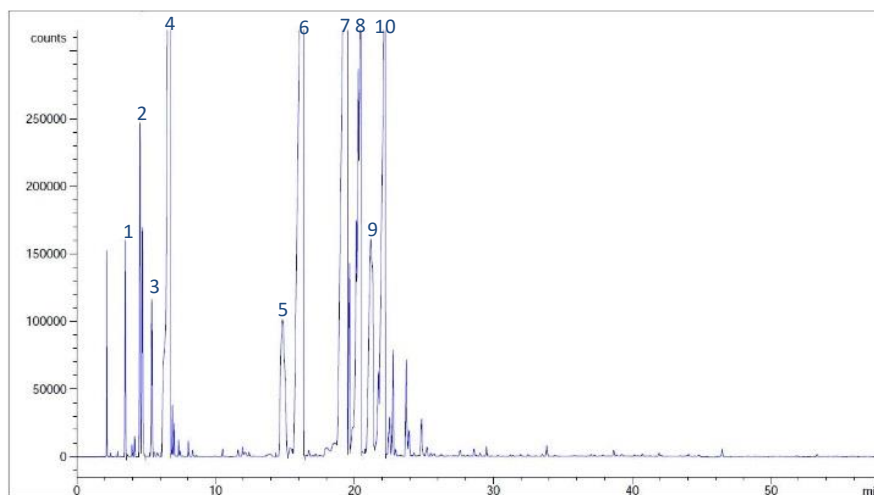


Figura 34- Cromatograma do óleo essencial de *Calamintha nepeta* por análise GC-FID.
1- α -pineno; 2- β -pineno; 3- β -mirceno; 4-1,8-cineol; 5-Trans-hidrato de sabineno; 6- Isopulegona; 7-Isopulegol; 8- Piperitona; 9-Mentol; 10-(S)-(-)-pulegona.

II. Caraterização química dos extratos aquosos

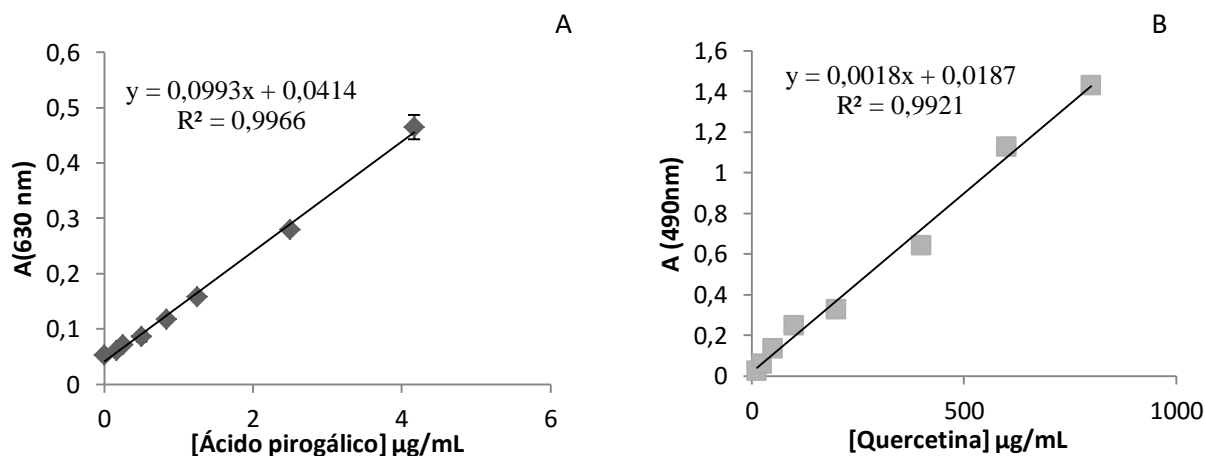


Figura 35- Curvas de calibração obtidas na quantificação de fenóis e flavonóides totais. A-Ácido pirogálico; B- Quercetina

III. Avaliação das propriedades antioxidantes

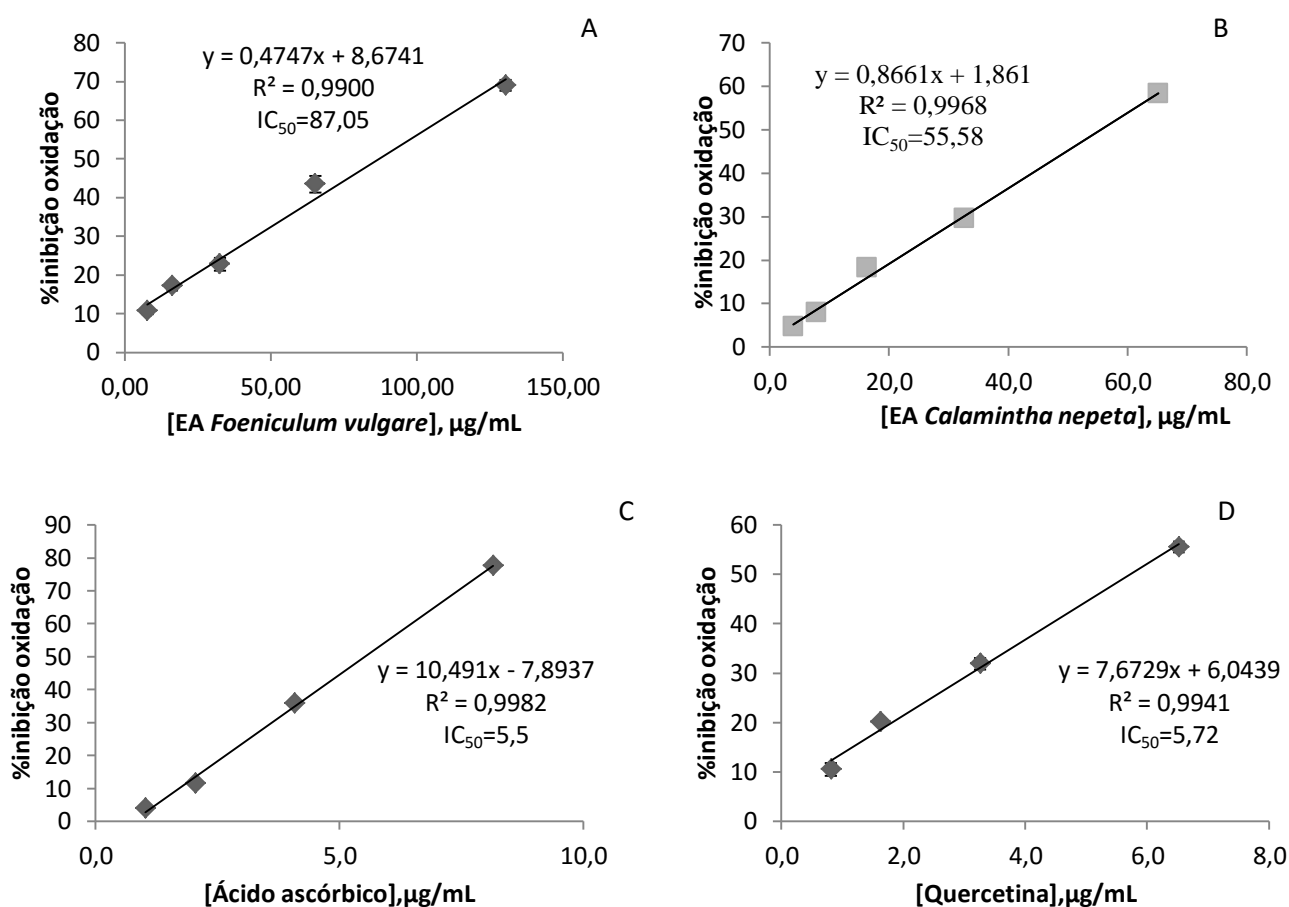


Figura 36- Atividade antioxidante pelo método do radical DPPH.

A-Extrato de *F.vulgare*; B- Extrato de *C.nepeta*; C-Curva de calibração do ácido ascórbico D- Curva de de calibração da quercetina C- curva de calibração obtida para o extrato aquoso de *F. vulgare* D- curva de calibração obtida para o extrato de *C.nepeta*.

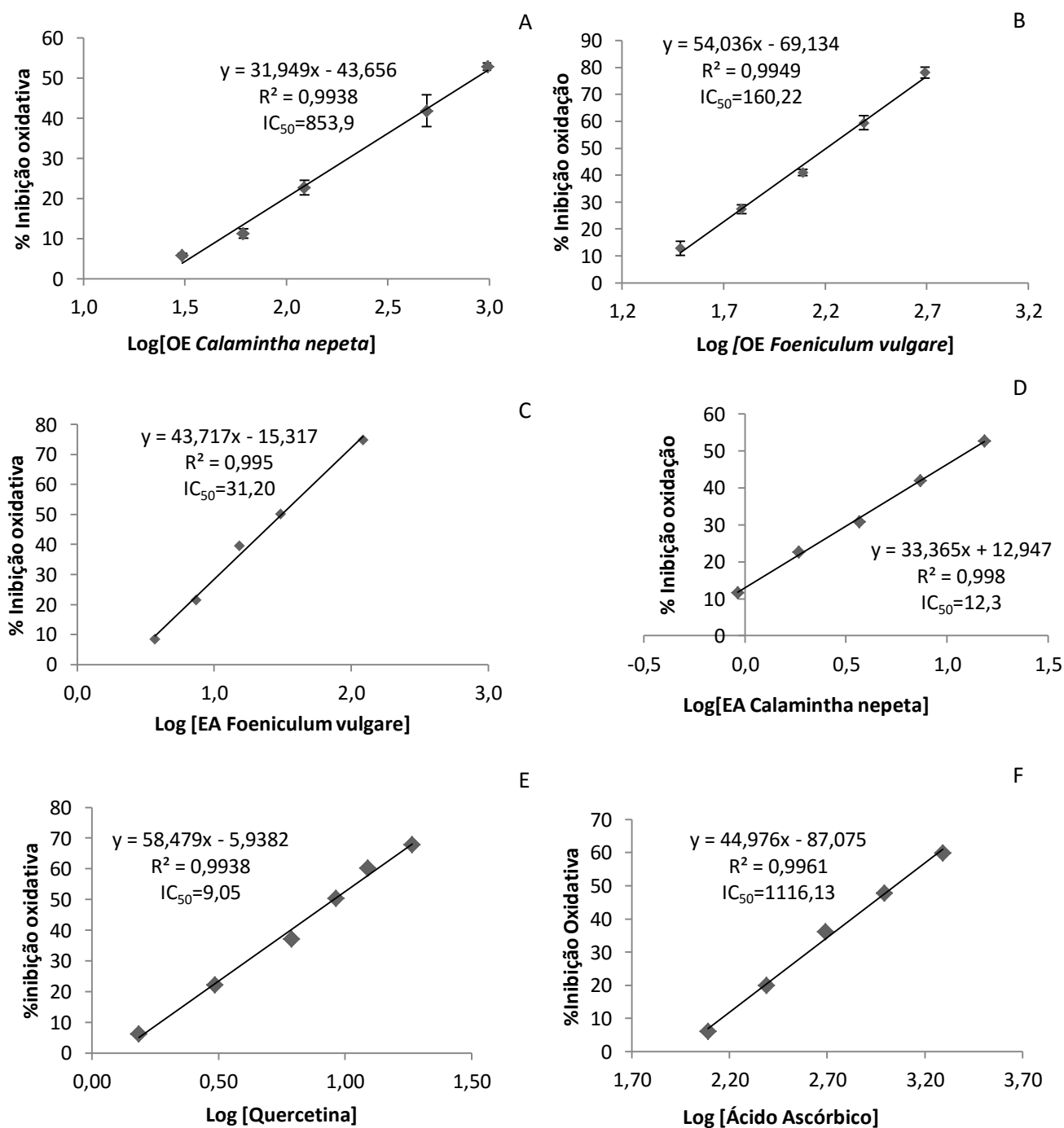


Figura 37- Atividade antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoleico.

A-OE *C.nepeta*; B- OE *F.vulgare*; C –Extrato aquoso *F.vulgare*; D- Extrato aquoso *C.nepeta* ; E-Quercetina; F-Ácido ascórbico.

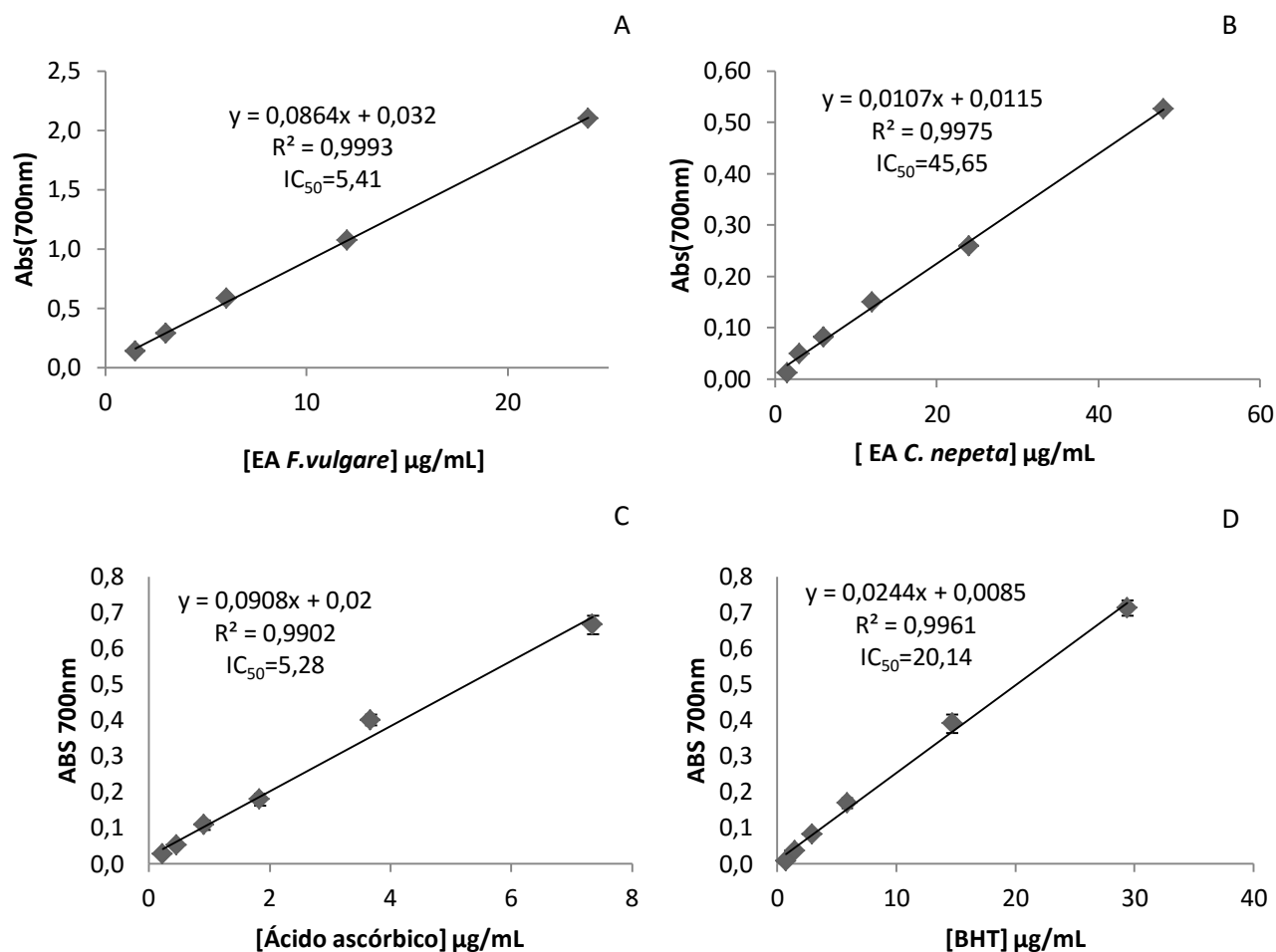


Figura 38- Atividade antioxidante pelo método do poder redutor.

A- extrato *F. vulgare* ; B- extrato aquoso *C. nepeta*; C- Curva de calibração do ácido ascórbico D- curva de calibração do BHT

IV. Avaliação da toxicidade “*in vivo*”

Quadro 11- Valores de DL₅₀ obtidos para os óleos essenciais e extratos aquosos

	DL ₅₀ (mg/kg)	
	<i>C.nepeta</i>	<i>F.vulgare</i>
Óleo essencial	2000	> 2000
Extrato aquoso	5000	> 5000

Quadro 12- Valores médios peso animal (g) ao longo dos diversos dias, nos animais administrados com óleo essencial de *C. nepeta*.

	Dia					
Dose (mg/kg)	0	1	2	3	7	14
Controlo	187,7 ± 17,9	191,7 ± 18,3	195,8 ± 16,9	199,8 ± 19,4	208,2 ± 11,9	202,5 ± 15,4
250	282,0 ± 23,6	289,0 ± 23,2	284,3 ± 24,4	290,5 ± 21,0	291,3 ± 18,6	296,8 ± 15,2
500	284,0 ± 24,0	281,3 ± 15,8	279,5 ± 13,8	280,8 ± 13,8	294,8 ± 15,0	294,8 ± 12,6
1000	266,0 ± 21,2	258,0 ± 24,0	247,0 ± 21,0	246,3 ± 16,6	259,0 ± 16,7	276,0 ± 15,6

Quadro 13- Valores médios peso animal (g) ao longo dos diversos dias, nos animais administrados com óleo essencial de *F. vulgare*.

	Dia					
Dose (mg/kg)	0	1	2	3	7	14
Controlo	187,7 ± 17,9	191,7 ± 18,3	195,8 ± 16,9	199,8 ± 19,4	208,2 ± 11,9	202,5 ± 15,4
500	256,5 ± 2,6	251,3 ± 2,1	255,8 ± 4,6	260,8 ± 9,5	262,5 ± 5,1	261,8 ± 5,6
1000	256,5 ± 9,0	239,0 ± 11,2	242,8 ± 5,0	245,5 ± 11,2	249,8 ± 11,7	256,3 ± 12,7
2000	266,4 ± 12,8	252,0 ± 9,9	239,2 ± 14,0	255,4 ± 16,2	256,8 ± 20,3	267,4 ± 15,6

V. Avaliação bioquímica da toxicidade hepática

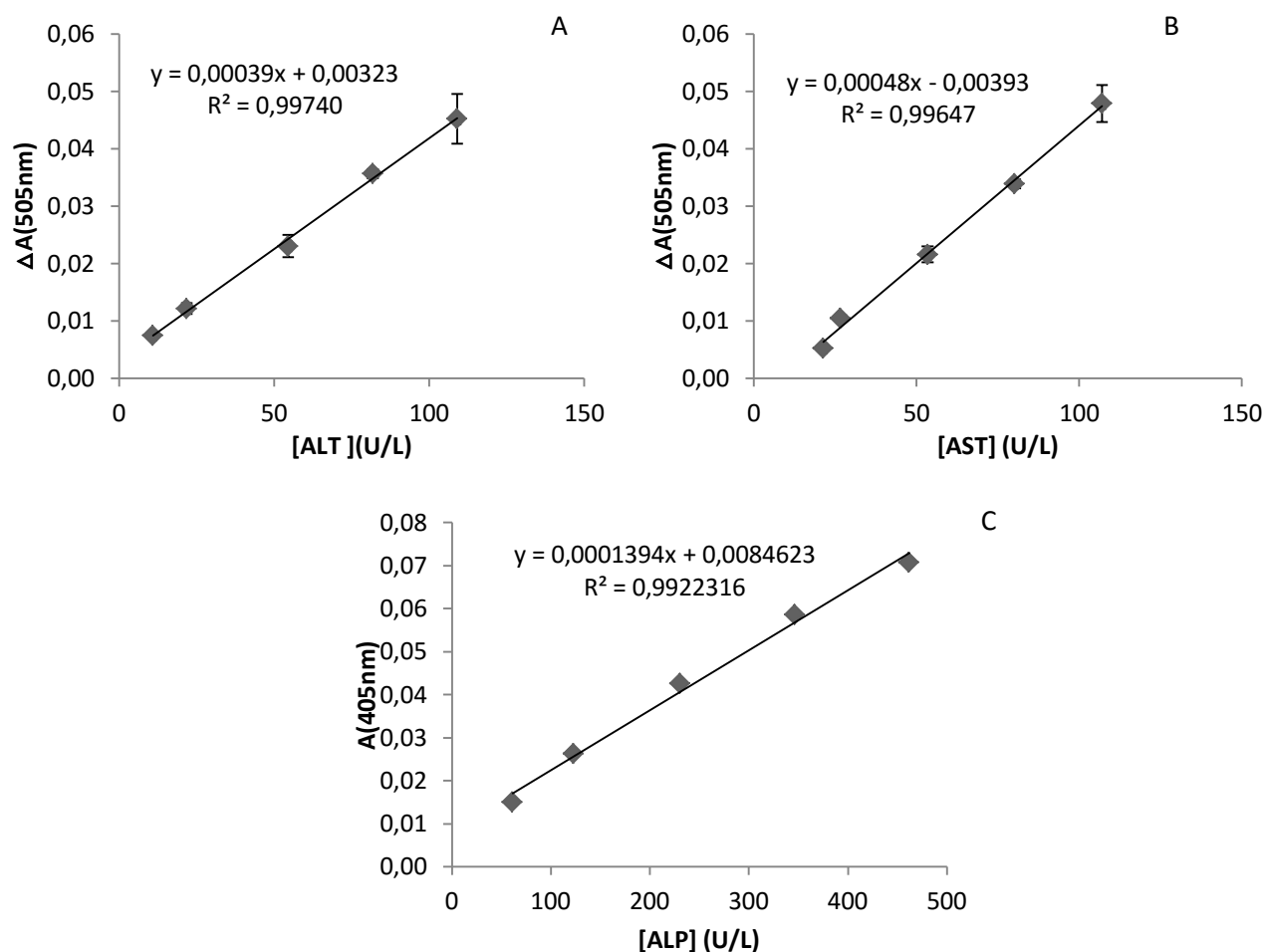


Figura 39- Curvas de calibração do controlo (CAL) obtidas para as aminotransferases A-Alanina aminotransferase; B- Aspartato aminotransferase; C- Fosfatase alcalina.

VI. Avaliação bioquímica da toxicidade renal

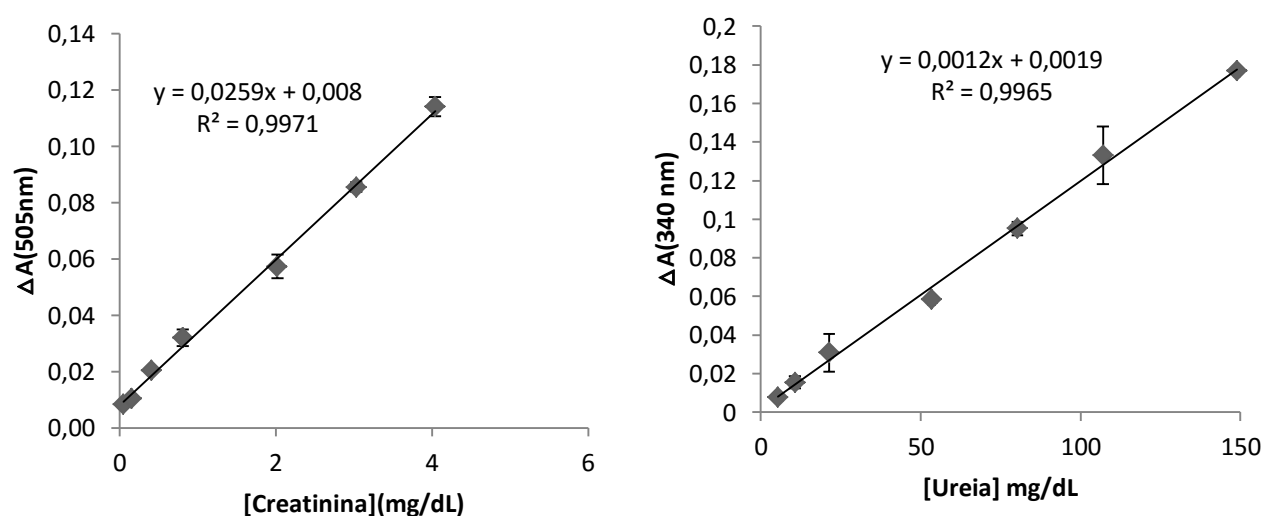


Figura 40- Curva de calibração do controlo (CAL).
A-Creatinina; B-Ureia

Quadro 14- Análise sumária da urina nas urinas dos animais administrados via oral com óleo essencial de *F. vulgare* nas diferentes doses e dias.

	Dose																					
	Controlo				500 mg/kg						1000 mg/kg						2000 mg/kg					
Dia	0	1	2	14	0	1	2	4	9	14	0	1	2	4	9	14	0	1	2	4	9	14
Densidade	1,011	1,01	1,01	1,005	1,01	1,015	1,01	1	1,01	1,005	1,01	1,015	1,01	1	1,01	1,005	1,01	1,015	1,01	1	1,01	1,005
pH	7	8	8	8	7	7	8	9	8	8	7	6	8	9	8	8	7	7	8	9	8	8
Leucócitos (leu/ μ L)	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
Nitritos	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Proteínas	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
corpos cetónicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
urobilinogénio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bilirrubina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sangue	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 15- Análise sumária da urina nas urinas dos animais administrados via oral com óleo essencial de *C.nepeta* nas diferentes doses e dias.

	Dose																					
	Controlo				250 mg/kg						500 mg/kg						1000 mg/kg					
Dia	0	1	2	14	0	1	2	4	7	14	0	1	2	4	7	14	0	1	2	4	7	14
Densidade	1,01	1,01	1,01	1,05	1,01	1,01	1,05	1,01	1	1	1,01	1,01	1,01	1,05	1,05	1	1,01	1,02	1,05	1,05	1,05	1,05
pH	7	8	8	8	7	7	8	7	9	9	7	7	7	8	8	9	7	6	7	8	8	9
Leucócitos (Ieu/μL)	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	+	+	1+	1+	1+	1+	1+	+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
Nitritos	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Proteínas	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	+	+	1+	1+	1+	1+	1+	+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
corpos cetónicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1+	-	-	-	-	-	1+	-	-	-	-	-
urobilinogénio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bilirrubina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sangue	-	-	-	-	-	1+	-	-	-	-	1+	2+	1+	1+	-	1+	2+	3+	1+	-	-	-

VII. Análise estatística

Quadro 16- Análise de variância ANOVA para avaliação da atividade antioxidante dos OEs pelo método DPPH

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
OE_Inibição_oxidação	Between Groups	47,965	5	9,593	133,949	,000
	Within Groups	,859	12	,072		
	Total	48,824	17			
OE_EQ_quercetina	Between Groups	3,469	5	,694	128,217	,000
	Within Groups	,065	12	,005		
	Total	3,534	17			
OE_EQ_ácido_ascórbico	Between Groups	3,528	5	,706	141,901	,000
	Within Groups	,060	12	,005		
	Total	3,587	17			

Quadro 17- Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH para os OEs.

OE_Inibição_oxidação					
Tukey B ^a					
Concentração_OE	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
OE_F_1200	3	2,0133	4,0300	4,7100	5,6967
OE_C_1200	3	2,0200			
OE_F_2500	3				
OE_C_2500	3				
OE_F_5000	3				5,6967
OE_C_5000	3				6,1933

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Quadro 18- Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH para os extratos aquosos.

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Inibição_oxidação	Between Groups	59993,002	15	3999,533	2025,401	,000
	Within Groups	157,975	80	1,975		
	Total	60150,977	95			
EQ_ácido_ascórbico	Between Groups	497,760	15	33,184	2142,723	,000
	Within Groups	1,177	76	,015		
	Total	498,937	91			

Quadro 19-Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH dos extratos aquosos.

Inibição_oxidação													
Tukey B ^a													
amostra	N	Subset for alpha = 0.05											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Extrato_C_3,9	6	3,1											
Extrato_F_3,9	6	5,1											
Extrato_C_7,8	6		7,8										
Extrato_F_7,8	6			10,7									
Extrato_F_16,3	6				17,2								
Extrato_C_16,3	6				18,2								
Extrato_F_32,6	6					22,8							
Extrato_C_32,6	6						29,6						
Extrato_F_65,2	6							43,5					
Extrato_C_260,8	6								57,9				
Extrato_C_65,2	6								58,2				
Extrato_C_195,6	6									60,6			
Extrato_F_130,4	6										65,7		
Extrato_F_521,7	6										66,9	66,9	
Extrato_F_260,8	6											68,9	68,9
Extrato_C_130,4	6												69,9

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

Quadro 20- Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antioxidante dos OEs pelo método β -caroteno/ácido linoleico

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
conc	Between Groups	164062,500	8	20507,812	.	.
	Within Groups	,000	18	,000		
	Total	164062,500	26			
inibição_oxidacao	Between Groups	6751,173	8	843,897	337558,643	,000
	Within Groups	,045	18	,003		
	Total	6751,218	26			
concentração	Between Groups	18,000	8	2,250	.	.
	Within Groups	,000	18	,000		
	Total	18,000	26			

Quadro 21- Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoleico para os OEs.

inibição_oxidacao										
Tukey B ^a										
Amostra	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
AA_62,5	3	6,1								
Calamintha_62,5	3		11,3							
AA_125	3			19,9						
C_125	3				22,7					
Funcho_62,5	3					27,3				
AA_250	3						36,2			
F_125	3							41,1		
C_250	3								41,9	
F_250	3									59,5

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 22- Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos aquosos pelo método β -caroteno/ácido linoleico.

ANOVA

inibicao_oxidacao

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6966,525	8	870,816	348326,273	,000
Within Groups	,045	18	,003		
Total	6966,570	26			

Quadro 23- Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoleico para os extratos aquosos

inibicao_oxidacao

Tukey B^a

Amostra	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Funcho_4_ug/mL	3	8,4								
F_8_ug/mL	3		21,5							
Quercetina_4_ug/mL	3			27,4						
Calamintha_4_ug/mL	3				30,8					
F_16_ug/mL	3					39,6				
C_8_ug/mL	3						42,0			
Quercetina_8_ug/mL	3							46,9		
C_16_ug/mL	3								52,7	
Quercetina_16_ug/mL	3									64,5

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 24- Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antioxidante dos OEs aquosos pelo método do poder redutor.

ANOVA

Inibição_oxidação

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,066	9	,007	4,895	,002
Within Groups	,030	20	,001		
Total	,095	29			

Quadro 25- Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante pelo método do poder redutor para os OEs.

Inibição_oxidação

Tukey B^a

OE_concentração	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
OE_F_250	3	,0143		
OE_F_500	3	,0143		
OE_C_250	3	,0163		
OE_F_1000	3	,0240		
OE_F_750	3	,0243		
OE_C_500	3	,0330	,0330	
OE_C_750	3	,0457	,0457	
OE_C_1000	3	,0503	,0503	
OE_F_2000	3		,1320	,1320
OE_C_2000	3			,1490

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 26- Análise de variância ANOVA para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos aquosos pelo método do poder redutor.

ANOVA

Absorvância

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	23,749	5	4,750	1899,908	,000
Within Groups	,030	12	,003		
Total	23,779	17			

Quadro 27- Teste de Tukey para avaliação da atividade antioxidante pelo método do poder redutor para os extratos aquosos.

Absorvância

Tukey B^a

Amostra	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Calamintha_12_ug/mL	3	,150				
Calamintha_24_ug/mL	3	,260				
Calmintha_48_ug/mL	3		,526			
Funcho_12_ug/mL	3			1,074		
Funcho_24_ug/mL	3				2,098	
Funcho_48_ug/mL	3					3,360

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 28- Análise de variância ANOVA para os biomarcadores séricos.

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ALT	Between Groups	3874,725	6	645,788	18,204	,000
	Within Groups	2731,504	77	35,474		
	Total	6606,229	83			
AST	Between Groups	41967,321	6	6994,553	14,257	,000
	Within Groups	37776,186	77	490,600		
	Total	79743,506	83			
ALP	Between Groups	115789,153	6	19298,192	11,950	,000
	Within Groups	124351,882	77	1614,960		
	Total	240141,036	83			
Creatinina	Between Groups	1,192	6	,199	30,950	,000
	Within Groups	,494	77	,006		
	Total	1,686	83			
Ureia	Between Groups	2836,480	6	472,747	7,413	,000
	Within Groups	4910,821	77	63,777		
	Total	7747,301	83			

Quadro 29- Teste de Duncan para avaliação da enzimática da ALT para os OEs.

ALT					
Duncan ^{a,b}					
Amostra	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
OE_calaminta_250mg/kg	12	25,1467			
OE_calaminta_1000mg/kg	12		30,6418		
OE_calaminta_500mg/kg	12		31,9258		
OE_funcho_500mg/kg	12		32,7441		
OE_funcho_1000mg/kg	12		34,0257		
OE_funcho_2000mg/kg	15			42,0260	
Controlo	9				48,1711
Sig.		1,000	,215	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 11,776.

Quadro 30- Teste de Duncan para avaliação da enzimática da AST para os OEs.

AST

Duncan^{a,b}

Amostra	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
OE_funcho_2000mg/kg	15	73,4525				
OE_calaminta_250mg/kg	12		92,3825			
OE_funcho_1000mg/kg	12		108,4817	108,4817		
OE_calaminta_1000mg/kg	12		110,9692	110,9692		
OE_funcho_500mg/kg	12			119,8233	119,8233	
OE_calaminta_500mg/kg	12				137,7125	137,7125
Controlo	9					139,4856
Sig.		1,000	,057	,246	,054	,847

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 11,776.

Quadro 31- Teste de Duncan para avaliação da enzimática da ALP para os OEs.

ALP

Duncan^{a,b}

Amostra	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
OE_funcho_500mg/kg	12	147,0642	
OE_funcho_1000mg/kg	12	152,6058	
Controlo	9	154,8578	
OE_calaminta_1000mg/kg	12	162,4950	
OE_funcho_2000mg/kg	15	164,7718	
OE_calaminta_500mg/kg	12		225,4808
OE_calaminta_250mg/kg	12		248,3775
Sig.		,350	,171

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 11,776.

Quadro 32- Teste de Duncan para quantificação de creatinina no soro dos animais administrados com o OE de *F.vulgare* e *C.nepeta*.

Creatinina				
Duncan ^{a,b}				
Amostra	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
OE_calaminta_250mg/kg	12	,2450		
OE_calaminta_1000mg/kg	12	,2800		
OE_calaminta_500mg/kg	12	,2983		
OE_funcho_1000mg/kg	12		,4467	
Controlo	9		,5100	,5100
OE_funcho_2000mg/kg	15			,5252
OE_funcho_500mg/kg	12			,5417
Sig.		,131	,059	,371

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 11,776.

Quadro 33- Teste de Duncan para quantificação de ureia no soro dos animais administrados com o OE de *F.vulgare* e *C.nepeta*.

Ureia				
Duncan ^{a,b}				
Amostra	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
OE_calaminta_500mg/kg	12	28,5992		
OE_calaminta_250mg/kg	12	34,3425	34,3425	
OE_calaminta_1000mg/kg	12		37,0942	
OE_funcho_2000mg/kg	15		39,0944	39,0944
Controlo	9			44,2444
OE_funcho_500mg/kg	12			45,0183
OE_funcho_1000mg/kg	12			45,7833
Sig.		,085	,178	,066

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 11,776.

Quadro 34-Análise de variância ANOVA para a quantificação de creatinina nas urinas dos animais administrados com OE de *C.nepeta*.

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Dia_0	Between Groups	,087	3	,029	9,841	,005
	Within Groups	,023	8	,003		
	Total	,110	11			
Dia_1	Between Groups	,062	3	,021	8,296	,008
	Within Groups	,020	8	,003		
	Total	,082	11			
Dia_2	Between Groups	,415	3	,138	62,116	,000
	Within Groups	,018	8	,002		
	Total	,432	11			
Dia_7	Between Groups	,576	3	,192	24,495	,000
	Within Groups	,063	8	,008		
	Total	,638	11			
Dia_14	Between Groups	,052	3	,017	6,257	,017
	Within Groups	,022	8	,003		
	Total	,074	11			

Quadro 35- Teste de Duncan para quantificação de creatinina na urina dos animais administrados com o OE de *C.nepeta* no dia 0.

Dia_0			
Duncan ^a			
Dose	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1000 mg/kg	3	,5067	
250 mg/kg	3	,5533	
controlo	3		,6967
500 mg/kg	3		,6967
Sig.		,322	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 36 -Teste de Duncan para quantificação de creatinina na urina dos animais administrados com o OE de *C.nepeta* no dia 1

Dia_1

Duncan^a

Dose	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1000 mg/kg	3	,3067		
500 mg/kg	3	,3767	,3767	
250 mg/kg	3		,4133	,4133
controlo	3			,5067
Sig.		,125	,396	,052

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 37 -Teste de Duncan para quantificação de creatinina na urina dos animais administrados com o OE de *C.nepeta* no dia 2.

Dia_2

Duncan^a

Dose	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1000 mg/kg	3	,2833		
controlo	3		,6400	
250 mg/kg	3		,7133	,7133
500 mg/kg	3			,7533
Sig.		1,000	,093	,329

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 38 -Teste de Duncan para quantificação de creatinina na urina dos animais administrados com o OE de *C.nepeta* no dia 7.

Dia_7

Duncan^a

Dose	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1000 mg/kg	3	,4300		
controlo	3		,6100	
500 mg/kg	3			,9200
250 mg/kg	3			,9567
Sig.		1,000	1,000	,626

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 39- Teste de Duncan para quantificação de creatinina na urina dos animais administrados com o OE de *C.nepeta* no dia 14.

Dia_14

Duncan^a

Dose	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1000 mg/kg	3	,4100		
500 mg/kg	3	,4800	,4800	
controlo	3		,5367	,5367
250 mg/kg	3			,5867
Sig.		,142	,224	,278

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 40- Análise de variância ANOVA para a quantificação de creatinina nas urinas dos animais administrados com OE de *F.vulgare*.

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Dia_0	Between Groups	,048	3	,016	1,985	,195
	Within Groups	,065	8	,008		
	Total	,113	11			
Dia_1	Between Groups	,481	3	,160	21,267	,000
	Within Groups	,060	8	,008		
	Total	,542	11			
Dia_2	Between Groups	,432	3	,144	15,506	,001
	Within Groups	,074	8	,009		
	Total	,506	11			
Dia_7	Between Groups	,236	3	,079	10,182	,004
	Within Groups	,062	8	,008		
	Total	,298	11			
Dia_14	Between Groups	,278	3	,093	36,722	,000
	Within Groups	,020	8	,003		
	Total	,298	11			

Quadro 41-Teste de Duncan para quantificação de creatinina na urina dos animais administrados com o OE de *F.vulgare* no dia 0.

Dia_0		
Duncan ^a		
Dose	N	Subset for alpha = 0.05
		1
500 mg/kg	3	,6333
controlo	3	,7700
2000 mg/kg	3	,7700
1000 mg/kg	3	,7933
Sig.		,075

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 42- Teste de Duncan para quantificação de creatinina na urina dos animais administrados com o OE de *F. vulgare* no dia 1.

Dia_1

Duncan^a

Dose	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1000 mg/kg	3	,4467		
controlo	3		,7933	
2000 mg/kg	3		,8200	
500 mg/kg	3			1,0000
Sig.		1,000	,717	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 43- Teste de Duncan para quantificação de creatinina na urina dos animais administrados com o OE de *F. vulgare* no dia 2.

Dia_2

Duncan^a

Dose	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1000 mg/kg	3	,5133		
2000 mg/kg	3	,5267		
controlo	3		,7667	
500 mg/kg	3			,9733
Sig.		,870	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 44-Teste de Duncan para quantificação de creatinina na urina dos animais administrados com o OE de *F. vulgare* no dia 7.

Dia_7

Duncan^a

Dose	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
controlo	3	,6333	
1000 mg/kg	3	,6867	
2000 mg/kg	3	,6900	
500 mg/kg	3		,9900
Sig.		,471	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 45-Teste de Duncan para quantificação de creatinina na urina dos animais administrados com o OE de *F. vulgare* no dia 14.

Dia_14

Duncan^a

Dose	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1000 mg/kg	3	,5200			
2000 mg/kg	3		,6767		
controlo	3			,7967	
500 mg/kg	3				,9333
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 46- Análise de variância ANOVA para a quantificação de ureia nas urinas dos animais administrados com OE de *C.nepeta*.

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Dia_0	Between Groups	9,483	3	3,161	,491	,698
	Within Groups	51,533	8	6,442		
	Total	61,015	11			
Dia_1	Between Groups	75,375	3	25,125	3,479	,070
	Within Groups	57,771	8	7,221		
	Total	133,147	11			
Dia_2	Between Groups	98,679	3	32,893	6,665	,014
	Within Groups	39,482	8	4,935		
	Total	138,161	11			
Dia_7	Between Groups	377,223	3	125,741	24,427	,000
	Within Groups	41,181	8	5,148		
	Total	418,404	11			
Dia_14	Between Groups	31,363	3	10,454	4,277	,045
	Within Groups	19,555	8	2,444		
	Total	50,918	11			

Quadro 47- Teste de Duncan para quantificação de ureia na urina dos animais administrados com o OE de *C.nepeta* no dia 0.

Dia_0		
Duncan ^a		
Dose_mg_kg	N	Subset for alpha = 0.05
		1
1000 mg/kg	3	28,4300
controlo	3	30,0800
250 mg/kg	3	30,0933
500 mg/kg	3	30,8667
Sig.		,300

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 48- Teste de Duncan para quantificação de ureia na urina dos animais administrados com o OE de *C.nepeta* no dia 1.

Dia_1

Duncan^a

Dose_mg_kg	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1000 mg/kg	3	23,3067	
500 mg/kg	3	23,8333	23,8333
controlo	3	28,4300	28,4300
250 mg/kg	3		28,7000
Sig.		,055	,066

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 49- Teste de Duncan para quantificação de ureia na urina dos animais administrados com o OE de *C.nepeta* no dia 2.

Dia_2

Duncan^a

Dose_mg_kg	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
250 mg/kg	3	26,5000		
controlo	3	29,3333	29,3333	
1000 mg/kg	3		32,8067	32,8067
500 mg/kg	3			33,7000
Sig.		,157	,092	,636

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 50- Teste de Duncan para quantificação de ureia na urina dos animais administrados com o OE de *C.nepeta* no dia 7.

Dia_7

Duncan^a

Dose_mg_kg	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
250 mg/kg	3	30,0000	
controlo	3	30,5433	
1000 mg/kg	3	33,2233	
500 mg/kg	3		43,8933
Sig.		,134	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 51 -Teste de Duncan para quantificação de ureia na urina dos animais administrados com o OE de *C.nepeta* no dia 14.

Dia_14

Duncan^a

Dose_mg_kg	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
controlo	3	29,6367	
500 mg/kg	3		32,9333
250 mg/kg	3		33,0667
1000 mg/kg	3		33,8467
Sig.		1,000	,512

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 52- Análise de variância ANOVA para a quantificação de ureia nas urinas dos animais administrados com OE de *F.vulgare*.

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Dia_0	Between Groups	121,117	3	40,372	4,248	,045
	Within Groups	76,025	8	9,503		
	Total	197,142	11			
Dia_1	Between Groups	1702,623	3	567,541	41,138	,000
	Within Groups	110,369	8	13,796		
	Total	1812,992	11			
Dia_2	Between Groups	2307,423	3	769,141	6,294	,017
	Within Groups	977,576	8	122,197		
	Total	3284,998	11			
Dia_7	Between Groups	7195,139	3	2398,380	351,599	,000
	Within Groups	54,571	8	6,821		
	Total	7249,709	11			
Dia_14	Between Groups	976,153	3	325,384	14,246	,001
	Within Groups	182,724	8	22,840		
	Total	1158,877	11			

Quadro 53- Teste de Duncan para quantificação de ureia na urina dos animais administrados com o OE de *F.vulgare* no dia 0.

Dia_0			
Duncan ^a			
Dose_mg_kg	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1000 mg/kg	3	23,9333	
controlo	3	27,8200	27,8200
2000 mg/kg	3		30,0000
500 mg/kg	3		32,6033
Sig.		,161	,106

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 54- Teste de Duncan para quantificação de ureia na urina dos animais administrados com o OE de *F.vulgare* no dia 1.

Dia_1

Duncan^a

Dose_mg_kg	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1000 mg/kg	3	20,4200		
controlo	3	23,9333		
2000 mg/kg	3		32,1267	
500 mg/kg	3			51,1933
Sig.		,280	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 55- Teste de Duncan para quantificação de ureia na urina dos animais administrados com o OE de *F.vulgare* no dia 2.

Dia_2

Duncan^a

Dose_mg_kg	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2000 mg/kg	3	29,3367	
controlo	3	30,0000	
1000 mg/kg	3	35,8300	
500 mg/kg	3		63,2100
Sig.		,509	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 56- Teste de Duncan para quantificação de ureia na urina dos animais administrados com o OE de *F.vulgare* no dia 7.

Dia_7

Duncan^a

Dose_mg_kg	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
500 mg/kg	3	19,3500		
2000 mg/kg	3		26,2700	
controlo	3		27,2100	
1000 mg/kg	3			80,3900
Sig.		1,000	,671	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 57- Teste de Duncan para quantificação de ureia na urina dos animais administrados com o OE de *F.vulgare* no dia 14.

Dia_14

Duncan^a

Dose_mg_kg	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
500 mg/kg	3	20,6267		
controlo	3		29,7100	
2000 mg/kg	3		31,1267	
1000 mg/kg	3			45,7900
Sig.		1,000	,726	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Quadro 58 - Análise de variância ANOVA para a clearance da creatinina nos animais administrados com OE de *C.nepeta* e *F.vulgare*.

ANOVA

clearance

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,585	6	,264	8,194	,000
Within Groups	1,257	39	,032		
Total	2,842	45			

Quadro 59- Teste de Duncan para avaliação da clearance da creatinina nos animais administrados com OE de *C.nepeta* e *F.vulgare*.

clearance

Duncan^{a,b}

Amostra	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
OE_funcho_500mg/kg	7	1,1514	
OE_funcho_1000mg/kg	6	1,1683	
controlo	6	1,2400	
OE_funcho_2000mg/kg	8	1,2900	
OE_calaminta_250mg/kg	7		1,5100
OE_calaminta_500mg/kg	6		1,6000
OE_calaminta_1000mg/kg	6		1,6283
Sig.		,213	,270

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,497.

